



Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles à base de poly(acide lactique) et de poly(éthylène glycol) pour la délivrance de principes actifs

Fanny Coumes

► To cite this version:

Fanny Coumes. Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles à base de poly(acide lactique) et de poly(éthylène glycol) pour la délivrance de principes actifs. Polymères. Université Montpellier I, 2014. Français. NNT : 2014MON13522 . tel-01342551

HAL Id: tel-01342551

<https://theses.hal.science/tel-01342551>

Submitted on 6 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Délivré par UNIVERSITE MONTPELLIER 1

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences

Chimiques 459

Et de l'unité de recherche CNRS UMR 5247

**Spécialité : Chimie et Physico-Chimie des
matériaux**

Présentée par Fanny Coumes

**Synthèse et caractérisation de copolymères
amphiphiles à base de poly(acide lactique)
et de poly(éthylène glycol) pour la
délivrance de principes actifs**

Soutenue le 18/12/2014 devant le jury composé de

Mme Christine JEROME, Professeur, Univ. Liège	Rapporteur
Mr Mathias DESTARAC, Professeur, Univ. Paul Sabatier	Rapporteur
Mr Sébastien LECOMMANDOUX, Professeur, Univ. Bordeaux I	Président du Jury
Mr Patrice WOISEL, Professeur, Univ. Lille 1	Examineur
Mr Suming LI, Directeur de Recherche, Univ. Montpellier II	Examineur
Mr Jean COUDANE, Professeur, Univ. Montpellier I	Examineur
Mr Dominique DOMURADO, Chargé de Recherche, Univ. Montpellier I	Directeur de thèse
Mr Vincent DARCOS, Ingénieur d'études, Univ. Montpellier I	Co-encadrant de thèse

Sommaire

Sommaire	1
Liste des Abréviations	6
Table des Figures	9
Table des Schémas	15
Table des Tableaux	18
Introduction Générale	20
Chapitre I : Copolymères amphiphiles, composition, synthèse et auto-assemblage	24
Introduction.....	24
A. Composition de copolymères amphiphiles	26
1. Polyesters aliphatiques : biodégradables & hydrophobes.....	26
2. Polyéthers : bioéliminables & hydrophiles.....	35
B. Synthèse de copolymères amphiphiles à base de polyester.....	37
1. Copolymères à blocs.....	37
2. Copolymères greffés.....	45
3. Copolymères multiblocs non linéaires	57
C. Auto-assemblage en milieu aqueux	61
1. Définitions	61
2. Formulation & Classification	63
3. Paramètres structuraux et caractérisations.....	68
4. Influence sur les paramètres structuraux	72
D. Application : Systèmes de délivrance contrôlée de principes actifs	76
1. Définitions	76
2. Auto-assemblages : encapsulation, transport, vectorisation et libération de molécules actives.....	78
3. Autres systèmes de délivrance de principes actifs utilisant une matrice polymère.....	83
Conclusion	84

E. Bibliographie.....	86
Chapitre II : Synthèse de copolymères greffés amphiphiles à base de poly(acide lactique), poly(acide glycolique) et oligo(éthylène glycol).....	104
Introduction.....	104
A. Synthèse du monomère fonctionnel 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione	107
1. Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque.....	108
2. Synthèse de l'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque.....	112
3. Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione	113
B. Copolymérisation par ouverture de cycle du glycolide propargylé du L-lactide.....	114
1. Copolymérisation avec l'octoate d'étain.....	115
2. Copolymérisations avec la <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine.....	121
C. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre	125
1. Synthèse de copolymères greffés avec l'anthracène	126
2. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles avec l'oligo(éthylène glycol)	129
D. Formation et caractérisation de nano-objets en milieu aqueux.....	137
1. Détermination de la concentration d'agrégation critique par (CAC) par spectroscopie de fluorescence	138
2. Détermination des diamètres et des morphologies	140
E. Encapsulation de principes actifs	142
1. La Clofazimine	143
2. La Curcumine.....	145
Conclusion	149
F. Bibliographie.....	151
Chapitre III : Synthèse de copolymères amphiphiles de type peigne à base de poly(acide lactique) et de poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol))	154
Introduction.....	154
A. Synthèse de copolymères peigne tribloc P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -P(OEGMA).....	157

1. Synthèse du macroamorceur difonctionnel.....	157
2. Synthèse des copolymères tribloc par polymérisation radicalaire de type ATRP.....	162
B. Synthèse de copolymères dibloc P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA	175
1. Synthèse du macroamorceur monofonctionnel ω -bromopoly(L-acide lactique)	175
2. Synthèse de copolymères dibloc par polymérisation radicalaire de type ATRP	177
C. Formation de nano-objets en milieu aqueux	179
1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC) par spectroscopie de fluorescence	179
2. Détermination des diamètres et des morphologies par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie électronique à transmission (TEM)	182
D. Encapsulation et cinétique de libération de principes actifs	186
1. Encapsulation de la curcumine.....	186
2. Etude comparative avec des systèmes à base de copolymères dibloc.....	189
3. Etudes préliminaires de libération de la curcumine	190
Conclusion	193
E. Bibliographie.....	195
Chapitre IV : Synthèse de copolymères amphiphiles et fonctionnalisation pour moduler l'efficacité des principes actifs <i>in vivo</i>	198
Introduction.....	198
A. Synthèse et fonctionnalisation de copolymère peigne tribloc.....	200
1. Fonctionnalisation du méthacrylate d' ω -hydroxy-oligo(éthylène glycol).....	202
2. Synthèse des copolymères (P(OEGMA)OMe- <i>co</i> -P(OEGMA)N ₃)- <i>b</i> -PLLA- <i>b</i> -(P(OEGMA)OMe- <i>co</i> -P(OEGMA)N ₃).....	203
3. Couplage du copolymère avec la rhodamine B.....	205
B. Synthèse d'un copolymère amphiphile dibloc et conjugaison à un peptide immunostimulateur	208
1. Synthèse du ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)- <i>bloc</i> -poly(acide lactique).....	208
2. Activation de la fonction acide carboxylique du bloc poly(éthylène glycol).....	211

3. Conjugaison du peptide immunostimulant au copolymère dibloc amphiphile	213
4. Formation de nano-objets en milieu aqueux et étude de stabilité.....	215
C. Evaluation des propriétés immunostimulantes du conjugué et comparaison avec d'autres systèmes	217
1. Efficacité immunostimulante sur les cellules dendritiques.....	217
2. Etude <i>in vivo</i> d'un système de délivrance d'un antigène sous forme d'émulsion avec le conjugué LD-Indolicidine-PEG- <i>b</i> -PLA.....	220
Conclusion	222
D. Bibliographie.....	223
Conclusion Générale.....	225
Chapitre V : Partie Expérimentale	228
A. Purification des réactifs	228
B. Matériel d'Analyse.....	228
1. Chromatographie d'Exclusion Stérique	228
2. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	229
3. Spectroscopie Infrarouge	229
4. Diffusion Dynamique de la Lumière	229
5. Spectroscopie de fluorescence.....	229
6. Spectroscopie de masse MALDI-TOF.....	230
7. Microscopies électronique à transmission.....	230
8. Spectroscopie ultraviolet visible	230
C. Etudes Physico-chimiques	230
1. Auto-assemblage en milieu Aqueux.....	230
2. Solubilisation et Encapsulation de Molécules Hydrophobes	232
3. Préparation des émulsions de polymères et étude de dégradation.....	235
D. Analyses Biologiques	236
1. Utilisation des souris et éthique.....	236
2. Culture des cellules dendritiques	236

3. Etude des cellules lymphatiques et immunisation.....	237
4. Etude sur les cellules tumorales.....	237
5. Analyses statistiques	237
E. Synthèses des copolymères greffés amphiphiles à base de poly(acide lactique), poly(acide glycolique) et oligo(éthylène glycol)	237
1. Protocole de synthèse général du monomère fonctionnel 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione.....	237
2. Protocole de synthèse général pour la copolymérisation par ouverture de cycle du glycolide propargylé et du L-lactide avec la N,N-diméthylaminopyridine	241
3. Protocoles de synthèses généraux pour les copolymères greffés par chimie « clic » : technique « Grafting onto »	242
F. Synthèses de copolymères amphiphiles de type peigne à base de poly(acide lactique) et poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol))	245
1. Protocole général pour la synthèse de copolymères triblocs P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -P(OEGMA)	246
2. Protocole général pour la synthèse des copolymères diblocs P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA	248
G. Synthèse de copolymères amphiphiles et fonctionnalisation pour moduler l'efficacité des principes actifs in vivo	251
1. Fonctionnalisation des systèmes triblocs.....	251
2. Synthèse et fonctionnalisation d'un copolymère dibloc linéaire.....	254
ANNEXES.....	257
A. Liste des communications orales ou par affiche	257
Communications orales.....	257
Communications par affiches.....	257
B. Publications	257

Liste des Abréviations

CRP	Polymérisation radicalaire contrôlée <i>(Controlled Radical Polymerization)</i>
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome <i>(Atom Transfer Radical Polymerization)</i>
RAFT	Polymérisation radicalaire par addition-fragmentation réversible <i>(Reversible Addition-Fragmentation Polymerization)</i>
ROP	Polymérisation par ouverture de cycle <i>(Ring-opening Polymerisation)</i>
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière <i>(Dynamic Light Scattering)</i>
CES	Chromatographie d'exclusion stérique <i>(Gel Permeation Chromatography)</i>
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
IR	Infrarouge
UV	Ultraviolet
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
TEM	Microscope à transmission électronique <i>(Transmission Electron Microscope)</i>
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Liste des Abréviations

PBS	Tampon Phosphate Salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
CMC	Concentration Micellaire Critique
CAC	Concentration d'Agrégation Critique
\bar{D}	Dispersité
M_n	Masse molaire moyenne en nombre
M_w	Masse molaire moyenne en poids
DCM	Dichlorométhane
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	N,N'-diméthylformamide
DBU	Diazabicycloundécène
THF	Tétrahydrofurane
TEA/ NEt_3	Triéthylamine
TBD	Triazabicyclodécène
$\text{Sn}(\text{Oct})_2$	Octoate d'étain
MsCl	Chlorure de Méthanesulfonyle
PGA	Glycolide monopropargylé
Br-OAc-Br	Bromure de Bromoacétyle
Br-P	Bromure de propargyle
Br-Ib-Br	Bromure de Bromoisobutyryle
Et-G	Ethyl-glyoxalate
A-G	Acide glyoxylique

Liste des Abréviations

PLA	Poly(acide lactique)
PGA	Poly(acide glycolique)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PEG	Poly(éthylène glycol)
OEG	oligo(éthylène glycol)
OEGMA	Méthacrylate d'oligo(éthylène glycol)
P(LA- <i>co</i> -GP- <i>co</i> -GA)- <i>g</i> -PEG	Copolymère statistique greffé à du PEG
P(LA- <i>co</i> -GP- <i>co</i> -GA)	Copolymère statistique de lactide et glycolide monopropargylé
PEG- <i>b</i> -PLA	Copolymère dibloc de PLA et PEG
PEPT- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PLA	Copolymère dibloc de PLA et PEG couplé à la LD-indolicidine
P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -P(OEGMA)	Copolymères peigne tribloc de PLA et OEGMA
PA	Principe Actif

Table des Figures

Figure I-1 Aperçu de quelques architectures obtenues par auto-assemblage	24
Figure I-2 Représentation schématique des stratégies de synthèse de copolymères dibloc (a) addition séquentielle de monomère ; (b) modification du bout de chaîne ; (c) amorceur difonctionnel ; (d) couplage de polymères ω fonctionnalisés préformés. I : Amorceur ; F : agent de fonctionnalisation ; * :site actif	38
Figure I-3 Représentation schématique des stratégies de synthèse de copolymères tribloc (a) addition séquentielle de monomères ; (b) utilisation d'un agent de couplage ; (c) et (d) couplage ou polymérisation à partir d'un polymère téléchélique α,ω fonctionnalisé I : Amorceur ; F : agent de fonctionnalisation ; * :site actif ; ac : agent de couplage ; DI : amorceur difonctionnel.....	41
Figure I-4 structure classique (à gauche) vs structure inverse (à droite)	46
Figure I-5 Aperçu des différentes techniques (A) grafting through (B) grafting onto (C) grafting from	46
Figure I-6 Technique de « grafting through »	47
Figure I-7 Illustration de la composition du copolymère greffé par la méthode « grafting through ».	48
Figure I-8 Synthèse de squelette polyester fonctionnel à partir de deux méthodes.....	49
Figure I-9 technique « grafting to » ou « grafting onto »	53
Figure I-10 Méthode "grafting from"	56
Figure I-11 Copolymère en étoile par les méthodes « core first » (1 et 2) et « arm first » (3)	58
Figure I-12 Architectures « miktoarm » par la méthode « core first »	59
Figure I-13 Schéma d'un tensioactif, comparable à un copolymère à bloc et auto-assemblage.....	62
Figure I-14 (A) Micelle ; (B) Polymersomes ; (C) Nanosphères ; (D) Nanocapsules La coloration blanche représente la partie hydrophile tandis que la coloration jaune représente la partie hydrophobe.....	64
Figure I-15 Auto-assemblage de copolymères dibloc, tribloc et greffé sous forme de micelles ¹⁶⁹	64
Figure I-16 Composition d'une vésicule constituée de copolymère amphiphile ou de phospholipide	65
Figure I-17 Procédé de la double émulsion ¹⁷⁹	66
Figure I-18 Composition des nanosphères et nanocapsules ¹⁸⁵	67
Figure I-19 Définition de la CMC	70
Figure I-20 Détermination de la concentration micellaire critique par conductimétrie (A) par fluorescence (B).....	71
Figure I-21 Détermination de la concentration micellaire critique par diffusion dynamique de la lumière ²⁰⁵	71

Figure I-22 (A) micelle "étoile" ; (B) micelle "crew-cut" bloc hydrophobe en noir et bloc hydrophile en rouge	73
Figure I-23 Influence de la longueur des blocs et du paramètre p sur la morphologie des objets formés	74
Figure I-24 Représentation Schématique des nano-objets en fonction de l'architecture initiale ²¹⁰	75
Figure I-25 Représentation Schématique des nano-objets en fonction de l'architecture initiale ¹³⁹	75
Figure I-26 (A) Doxorubicine (B) Paclitaxel (C) Amphotéricine B (D) Curcumine	77
Figure I-27 Profil de libération depuis un système de délivrance de principes actifs (rouge) vs système normal (bleu)	77
Figure I-28 Itinéraire d'un système NP après injection IV ²¹³ et absorption par l'effet EPR ²¹⁴	78
Figure I-29(A) Peptide RGD (B) Vitamine B9 ou acide folique (C) Mannose (D) Biotine	81
Figure I-30 Schéma de composition d'une cellule cancéreuse ²³⁰	81
Figure I-31 Illustration des mécanismes de traversée et de dégradation depuis un polymersome ²⁴² .	82
Figure I-32 Illustration de mécanismes actifs pour la libération de PA.....	83
Figure II-1 Spectre RMN ¹ H de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque	109
Figure II-2 Spectre FT-IR de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque.....	109
Figure II-3 Spectre RMN ¹ H de l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate d'éthyle	110
Figure II-4 Spectre FT-IR de l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate d'éthyle.....	110
Figure II-5 Spectre RMN ¹ H de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque	111
Figure II-6 Spectre FT-IR de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque.....	111
Figure II-7 Spectre RMN ¹ H de 2(2-bromoacétoxy)-4-pentynoate d'éthyle	112
Figure II-8 Spectre FT-IR de 2(2-bromoacétoxy)-4-pentynoate d'éthyle	112
Figure II-9 Spectre RMN ¹ H de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione	114
Figure II-10 Spectre FT-IR de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione.....	114
Figure II-11 Spectre RMN ¹ H typique d'un copolyester fonctionnel P(LA-co-GA-co-PGA) obtenu par polymérisation par ouverture de cycle avec l'octoate d'étain	117
Figure II-12 Spectre RMN ¹ H typique d'un copolyester fonctionnel P(LA-co-GA-co-PGA) obtenu par polymérisation par ouverture de cycle avec la DMAP	124
Figure II-13 Spectre MALDI du copolymère 5-10 obtenu par polymérisation par ouverture de cycle à 40°C, en présence de DMAP [BnOH]:[DMAP] = 1:2.5 et [4]+[LA]:[BnOH]=30:1	125
Figure II-14 Illustration de la CuAAC entre le copolyester et l'anthracène.....	126
Figure II-15 Spectre FT-IR du 9-azidométhylanthracène.....	127
Figure II-16 Spectre RMN ¹ H du 9-azidométhylanthracène	127

Figure II-17 Superposition des spectres infrarouges à différents temps de réaction confirmant le succès de la réaction de chimie « clic » entre le copolyester fonctionnel et l'anthracène azoturé ...	128
Figure II-18 Illustration de la chimie clic avec l'oligo(éthylène glycol).....	129
Figure II-19 Spectre infrarouge de l' α -azido- ω -méthoxy-oligo (éthylène glycol)	130
Figure II-20 Spectre RMN ^1H de l' α -azido- ω -méthoxy -oligo (éthylène glycol).....	131
Figure II-21 Superposition des spectres infrarouge effectués à t_0 et $t_f=24\text{h}$	132
Figure II-22 Spectre RMN ^1H typique d'un copolymère greffé.....	134
Figure II-23 CES du P(LA-co-GA-co-PGA)($M_n=3800\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,4$, trait continu) et P(LA-co-GA-co-PGA)-g-(OEG)($M_n=6000\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,3$, trait pointillé).....	136
Figure II-24 Spectre RMN DOSY typique d'un copolymère greffé.....	137
Figure II-25 Morphologie attendue des auto-assemblages de copolymères greffés amphiphiles en milieu aqueux.....	138
Figure II-26 Spectre d'excitation du pyrène en fonction de la concentration en copolymère	139
Figure II-27 Profil typique obtenu lors de la détermination de la CAC des nano-objets	139
Figure II-28 Profil de distribution des tailles typique, solution à 3 g.L^{-1} , par dissolution directe.....	140
Figure II-29 Image TEM du copolymère 11-2, solution à 1 g.L^{-1}	142
Figure II-30 Courbe de calibration de la clofazimine, $\lambda=468\text{nm}$	144
Figure II-31 Encapsulation de clofazimine par le copolymère 11-3 (T) clofazimine dans l'eau (A) Dissolution directe (B) Nanoprécipitation.....	145
Figure II-32 Résumé des champs d'action de la curcumine ³⁸	146
Figure II-33 Courbe de calibration de la curcumine, $\lambda=425\text{nm}$	147
Figure II-34 Dialyse en milieu aqueux du copolymère et de la curcumine	148
Figure II-35 Encapsulation de curcumine (A) témoin (B) Dissolution directe (C) Nanoprécipitation .	148
Figure II-36 Vue d'ensemble des dilactones fonctionnalisées "cliquables" existant à ce jour ^{14,21,39-41}	149
Figure III-1 Spectre RMN ^1H du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé (PLA(OH) ₂) possédant un DP_{PLA} de 20.....	158
Figure III-2 Spectre MALDI-TOF du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé PLA(OH) ₂ possédant un DP_{PLA} de 20.....	159
Figure III-3 Spectre RMN ^1H de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) PLA(Br) ₂ avec un DP_{PLA} de 20	161
Figure III-4 CES du polymère 1.1 ($M_n=3000\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1.1$, trait continu) et du polymère 2.1 ($M_n=2800\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1.1$, trait pointillés).....	161
Figure III-5 Spectre RMN ^1H typique du copolymère tribloc.....	164
Figure III-6 Spectre RMN DOSY des copolymères tribloc.....	165
Figure III-7 CES de la polymérisation d'OEGMA ₃₀₀ à différents temps de réaction.....	166

Figure III-8 Evolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour l'ATRP du OEGMA ₃₀₀ amorcée par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales : $[OEGMA_{300}]_0 / [PLA(Br)_2]_0 / [CuBr]_0 / [PMDETA]_0 = 25 / 1 / 2 / 4$ en solution dans l'anisole à 60°C.....	168
Figure III-9 Evolutions (A) de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps et (B) de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) en fonction de la conversion lors de l'ATRP de l'OEGMA ₃₀₀ amorcée par le PLA(Br) ₂ . Conditions expérimentales : $[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C.	168
Figure III-10 Evolution des $\ln[M]_0/[M]$ en fonction du temps pour l'ATRP du OEGMA ₃₀₀ amorcées par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales $[OEGMA_{300}]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/2/4$ (trait pointillé) et $[OEGMA_{300}]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/1/2/4$ (trait plein) en solution dans l'anisole à 60°C.....	170
Figure III-11 Evolution de $\ln[M]_0/[M]$ en fonction du temps pour l'ATRP des OEGMA ₃₀₀ , OEGMA ₄₇₅ et OEGMA ₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C .	171
Figure III-12 Evolution de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) en fonction de la conversion pour l'ATRP des OEGMA ₃₀₀ , OEGMA ₄₇₅ et OEGMA ₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C.....	171
Figure III-13 Evolution de $\ln[M]_0/[M]$ en fonction du temps pour l'ATRP des OEGMA ₃₀₀ , OEGMA ₄₇₅ et OEGMA ₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=50/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C .	172
Figure III-14 Evolution de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) en fonction de la conversion pour l'ATRP des OEGMA ₃₀₀ , OEGMA ₄₇₅ et OEGMA ₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br) ₂ Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=50/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C.....	173
Figure III-15 Spectre MALDI-TOF du PLA(OH)	176
Figure III-16 Spectre MALDI-TOF du PLA(Br).....	176
Figure III-17 (A) architecture de copolymère tribloc (B) architecture de copolymère dibloc et auto-assemblage.....	179
Figure III-18 Profil typique de détermination de la CAC pour les copolymères peigne tribloc.....	180
Figure III-19 Illustration de l'effet de la composition (f_{OEG} et B) et de l'architecture sur la stabilité de l'édifice et sur la concentration d'agrégation critique (CAC)	181
Figure III-20 Profil de distribution des tailles du copolymère 5-1, solution à 1g.L ⁻¹ , [PLA]/[OEGMA]=1/25	182

Figure III-21 Profil de distribution des tailles par DLS du copolymère 5-5 présentant 2 populations, solution à 1g.L^{-1} , $[\text{PLA}]/[\text{OEGMA}]=1/25$	183
Figure III-22 Image TEM du copolymère 5-1, solution à 1g.L^{-1}	184
Figure III-23 Image TEM du copolymère 5-3, solution à 1g.L^{-1}	184
Figure III-24 Image TEM du copolymère 5-6, solution à 1g.L^{-1}	185
Figure III-25 Illustration des objets sphériques obtenus pour les copolymères dibloc par TEM	185
Figure III-26 Principe de la méthodologie de "film-casting"	186
Figure III-27 Encapsulation de curcumine (A) à (E) solutions homogènes de copolymères avec la Curcumine (F) Tube témoin avec la curcumine dans l'eau	187
Figure III-28 Courbe de calibration de la curcumine, $\lambda=425\text{nm}$	188
Figure III-29 Courbe de calibration de la curcumine déterminée dans une solution de PBS contenant 0,5% de Tween 80 (w/v), $\lambda=425\text{ nm}$	191
Figure III-30 Libération typique à partir d'un boyau de dialyse (MWCO 3500 g.mol^{-1}) dans du PBS et du Tween 80	191
Figure III-31 Profil de libération de la curcumine à partir des copolymères (5-1) à (5-4) en fonction du temps.....	192
Figure IV-1 Fonctionnalisation d'un copolymère peigne tribloc	199
Figure IV-2 gauche : (A) Fonctionnalisation d'un copolymère dibloc et émulsion ; (B) Emulsion avec copolymère et indolicidine non liée	200
Figure IV-3 Stratégies envisagées pour l'obtention d'un copolymère peigne fonctionnalisé.....	201
Figure IV-4 Stratégie de synthèse du copolymère tribloc fonctionnel.....	202
Figure IV-5 Spectre RMN ^1H du monomère azoturé	203
Figure IV-6 Superposition IR du monomère azoturé.....	203
Figure IV-7 Superposition IR entre le macroamorceur 2 et le copolymère synthétisé 3-1 possédant 2 branches OEGMA(N_3)	205
Figure IV-8 Représentation schématique du copolymère (3)	206
Figure IV-9 Superposition CES et UV du copolymère (4).....	207
Figure IV-10 CES de HOOC-PEG ($M_{n,\text{CES}}= 6800\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M= 1.1$, trait continu) et HOOC-PEG- <i>b</i> -PLA ($M_{n,\text{CES}}= 9100\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M= 1.1$, traits pointillés).....	209
Figure IV-11 Spectre RMN DOSY du copolymère dibloc ($M_{n,\text{RMN}}=9100\text{g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$).....	209
Figure IV-12 Spectre RMN ^1H du copolymère dibloc ($M_{n,\text{RMN}}=9100\text{g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$)	210
Figure IV-13 Spectre RMN ^1H du copolymère dibloc NHS-PEG-PLA ($M_{n,\text{RMN}}=9000\text{g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$) ...	212
Figure IV-14 CES du HOOC-PEG- <i>b</i> -PLA ($M_n=9100\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$, trait continu) et du NHS-PEG- <i>b</i> -PLA ($M_n=9000\text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$, trait pointillé)	212

Figure IV-15 Spectre RMN DOSY du conjugué	214
Figure IV-16 Superposition des RMN DOSY du PLA- <i>b</i> -PEG, du peptide et du conjugué bleu : copolymère conjugué, rose : copolymère seule, vert : peptide seul	215
Figure IV-17 (A) aspects visuels (B) Analyse DLS des émulsions en fonction des conditions de stockage à 4°C, 25°C et 37°C pendant 6 mois.	216
Figure IV-18 Etude de la maturation des DC (A) expression en surface des cellules (B) sécrétion de cytokines et chimiokines sur les DC stimulées avec les différents composés.....	218
Figure IV-19 Activation des cellules dans les ganglions lymphatiques après injection sous-cutanées des différentes formulations (A) données récoltées sur les CD11c+ (B) expression des cytokines et chimiokines.....	219
Figure IV-20 Efficacité anti-tumorale des formulations contenant la protéine OVA sur les souris C57BL/6 présentant les cellules cancéreuses type EG7 (A) volume de la tumeur (B) taux de survie.....	221
Figure V-1 Dissolution directe	231
Figure V-2 Nanoprécipitation	231
Figure V-3 Encapsulation par dissolution directe.....	232
Figure V-4 Encapsulation par nanoprécipitation.....	233
Figure V-5 Encapsulation par "film-casting"	234

Table des Schémas

Schéma I-1 Voie d'obtention de la poly(ϵ -caprolactone) par polymérisation par ouverture de cycle .	28
Schéma I-2 Voie d'obtention du poly(acide lactique) par ROP ¹⁶	29
Schéma I-3 structures des stéréoisomères du lactide : (A) l-lactide; (B) d-lactide; (C) meso-lactide ...	29
Schéma I-4 Voies d'obtention du poly(acide glycolique)	30
Schéma I-5 Polymérisation par ouverture de cycle du lactide avec le mécanisme supposé de coordination-insertion ²⁷	32
Schéma I-6 Octoate d'étain (Sn(Oct) ₂)	32
Schéma I-7 Famille des pyridines (A) <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine (B) 4-pyrrolidinopyridine	33
Schéma I-8 (A) Mécanisme Nucléophile; (B) Mécanisme bifonctionnel	34
Schéma I-9 (A) Triazabicyclo[4.4.0]déc-1-ène (B) 1,8-Diazabicycloundéc-7-ène	35
Schéma I-10 Synthèse d'un copolymère dibloc PEG- <i>b</i> -polyester ⁶⁷	38
Schéma I-11 Synthèse d'un copolymère dibloc PLA- <i>b</i> -PEG ⁶⁸	39
Schéma I-12 Obtention de copolymères dibloc par la modification chimique des bouts de chaîne ⁶⁹ .	39
Schéma I-13 Synthèse d'un copolymère dibloc amphiphile à partir d'un amorceur difonctionnel ⁷⁰ ...	40
Schéma I-14 Couplage par chimie "clic" entre de la PCL et du poly(méthacrylate).....	40
Schéma I-15 Synthèse d'un copolymère tribloc PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG par couplage	42
Schéma I-16 Synthèse de copolymères tribloc PLA- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PLA de type BAB	43
Schéma I-17 Synthèse de copolymères tribloc de type ABA PEGMA- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEGMA à partir d'un amorceur difonctionnel et d'un macroamorceur PLA α,ω fonctionnalisé.....	43
Schéma I-18 Synthèse de copolymères tribloc de type ABA PEGMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEGMA à partir d'un amorceur difonctionnel et d'un macroamorceur PCL α,ω fonctionnalisé	43
Schéma I-19 Synthèse d'un copolymère tribloc ABA PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG ⁸¹	44
Schéma I-20 Illustration de la synthèse d'un multiblocs (ABA) _n ^{83,84}	45
Schéma I-21 Synthèse de copolymère greffé PCL-g-PEG par la technique « grafting through » ⁹³	47
Schéma I-22 Synthèse de copolymères greffés par la copolymérisation d'un macromonomère PCL et d'un co-monomère méthacrylate ^{96,97}	48
Schéma I-23 Homo ou copolymérisation du monomère fonctionnel.....	49
Schéma I-24 Monomères fonctionnalisés d' ϵ -caprolactone ^{94,101–104,105–107}	50
Schéma I-25 Monomères fonctionnalisés de lactide (gauche) et glycolide (droite) ^{38,108–110,111,112}	51
Schéma I-26 Modification chimique d'un polymère préformé ^{115–117}	52
Schéma I-27 Modification de la PCL ^{117,118,119}	52
Schéma I-28 Copolymère greffé PLA-g-PEG. ^{127,128}	54

Schéma I-29 Représentation de la chimie « clic »	54
Schéma I-30 Synthèse de copolymères greffés PCL-g-PEG par chimie « clic » ^{132,133}	55
Schéma I-31 Copolymères greffés par CuAAC (A) PCL-g-PDMAEMA (B) PCL-g-PEG et PCL-g-POx ¹³⁴⁻¹³⁷	55
Schéma I-32 Copolymère greffé de type poly(ϵ -caprolactone)-graft-polyméthacrylate ⁹⁴	56
Schéma I-33 Copolymère greffé de type poly(ϵ -caprolactone)-graft-poly(éthylène glycol)	56
Schéma I-34 Synthèse d'un copolymère en étoile (1) amorceur multifonctionnel ; (2) cœur poly(ϵ -caprolactone) à 4 branches ;(3) cœur avec extrémités de chaîne modifiées (4) copolymère en étoile (A ₄ B ₈) avec A : cœur poly(ϵ -caprolactone) hydrophobe ;B : chaînons hydrophiles poly(éthylène glycol)	58
Schéma I-35 Synthèse de copolymères en étoile de type « miktoarm » AB ₃ (1) Synthèse du bloc poly(acide lactique) porteur de trois fonctions azotures ; (2) synthèse du bloc polyméthacrylate fonctionnalisé par une fonction alcyne ; (3) couplage entre les fonctions azotures et alcynes par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre.....	60
Schéma I-36 Copolymères « miktoarm » de type (AB ₃) _n (4) Couplage entre deux blocs de PLA et le chlorure de téréphthaloyle fournissant une architecture "pompom" (AB ₃) ₂ ; (5) Couplage entre trois blocs de PLA et le chlorure de trimésyle fournissant une architecture étoile (AB ₃) ₃	60
Schéma I-37 Clivage de la liaison hydrazone et libération de la doxorubicine	84
Schéma II-1 Copolymérisation de l' ϵ -caprolactone modifiée par un groupement PEG avec l' ϵ -caprolactone ¹	104
Schéma II-2 Activation anionique de la PCL et greffage de branches hydrophiles de PEG ^{3,4}	105
Schéma II-3 Synthèse de copolymères greffés PCL-g-PEG à partir d'un squelette PCL fonctionnalisé par des groupements azoture ¹¹	106
Schéma II-4 Copolymérisation d'une lactone dipropargyl é avec son homologue non fonctionnalisé et couplage avec des branches de PEG azotures ¹⁴	106
Schéma II-5 Rétrosynthèse du glycolide monopropargylé	107
Schéma II-6 synthèse de l'acide 2-hydroxy 4-pentynoïque	108
Schéma II-7 Synthèse de l'éthyl -2-hydroxy-4-pentynoate ; protocole B	110
Schéma II-8 Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque ; protocole B	111
Schéma II-9 Synthèse de l'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque.....	112
Schéma II-10 Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione.....	113
Schéma II-11 Copolymérisation du L-lactide et du glycolide propargylé	115
Schéma II-12 Copolymérisation avec l'octoate d'étain	115
Schéma II-13 Copolymérisation avec la DMAP	121

Schéma II-14 synthèse du 9-azidométhylanthracène	126
Schéma II-15 Réaction de chimie « clic » permettant le greffage de l'anthracène sur le squelette polyester.....	128
Schéma II-16 Synthèse de l' α -azido- ω -méthoxy -oligo(éthylène glycol)	130
Schéma II-17 Obtention des copolymères greffés amphiphiles (11)	132
Schéma II-18 Structure chimique de la clofazimine	143
Schéma II-19 Structure chimique de la curcumine	146
Schéma III-1 processus de la polymérisation radicalaire contrôlée ATRP	156
Schéma III-2 Synthèse du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé PLA(OH) ₂	157
Schéma III-3 Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) PLA(Br) ₂	160
Schéma III-4 Monomères OEGMA(OMe) (A) 300 g.mol ⁻¹ ; (B) 475 g.mol ⁻¹ ; (C) 1000 g.mol ⁻¹	162
Schéma III-5 synthèse générale des copolymères tribloc	163
Schéma III-6 Synthèse du poly(acide lactique) ω hydroxylé PLA(OH).....	175
Schéma III-7 Synthèse de l' ω -bromopoly(acide lactique) PLA(Br)	176
Schéma III-8 Synthèse de copolymères dibloc	177
Schéma IV-1 rhodamine B isothiocyanate	200
Schéma IV-2 Structure du méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) hydroxyle en bout de chaîne.....	201
Schéma IV-3 Modification du méthacrylate d' ω -hydroxy-oligo(éthylène glycol).....	202
Schéma IV-4 Copolymère tribloc fonctionnalisé en bout de chaîne par des groupements azotures. 204	
Schéma IV-5 Couplage de la rhodamine B sur le copolymère peigne tribloc	206
Schéma IV-6 Synthèse de l' ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -poly(acide lactique).....	208
Schéma IV-7 Activation de la fonction terminale acide carboxylique.....	211
Schéma IV-8 Structure de la LD-indolicidine	213
Schéma IV-9 Couplage avec l'indolicidine	214
Schéma V-1 Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque.....	238
Schéma V-2 Synthèse de l'éthyl -2-hydroxy-4-pentynoate ; protocole B	239
Schéma V-3 Synthèse de l'acide 4-pentynoïque ; protocole B	239
Schéma V-4 Synthèse de l'acide 2-2-bromoacétoxy-4-pentynoïque	240
Schéma V-5 Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione	241
Schéma V-6 Copolymérisation du l-lactide et du glycolide propargylé	241
Schéma V-7 synthèse du 9-azidométhylanthracène	242
Schéma V-8 Réaction de chimie « clic »	243
Schéma V-9 synthèse de l' α -azido- ω -méthoxy-oligo(éthylène glycol)	244
Schéma V-10 Obtention des copolymères greffés (11).....	245

Schéma V-11 Synthèse du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé PLA(OH) ₂	246
Schéma V-12 Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) PLA(Br) ₂	247
Schéma V-13 synthèse générale des copolymères triblocs	248
Schéma V-14 Synthèse du ω –hydroxyl-poly(acide lactique) PLA(OH)	249
Schéma V-15 Synthèse de l' ω -bromopoly(acide lactique) PLA(Br)	249
Schéma V-16 Synthèse de copolymères diblocs	250
Schéma V-17 Modifications de la fonction hydroxyle terminale	251
Schéma V-18 Copolymère tribloc fonctionnalisé en bout de chaîne par des azotures	252
Schéma V-19 Couplage de la rhodamine B sur le copolymère tribloc	254
Schéma V-20 Synthèse de l' ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -poly(acide lactique).....	254
Schéma V-21 Activation de la fonction terminale acide carboxylique.....	255
Schéma V-22 Couplage avec l'indolidine	256

Table des Tableaux

Tableau I-1 Liste des principaux polyesters aliphatiques employés	27
Tableau I-2 Caractéristiques des polyesters aliphatiques	31
Tableau I-3 Catalyseurs organiques	33
Tableau I-4 polyéthers courants employés	36
Tableau I-5 Molécules tensioactives ou surfactantes	61
Tableau I-6 Paramètres structuraux et techniques de caractérisation ¹⁹¹	69
Tableau II-1 Influence des paramètres sur la voie A	108
Tableau II-2 Caractéristiques des copolymères P(PGA- <i>co</i> -GA- <i>co</i> -LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en solution avec l'octoate d'étain	116
Tableau II-3 Caractéristiques des copolymères P(PGA- <i>co</i> -GA- <i>co</i> -LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en masse avec l'octoate d'étain	120
Tableau II-4 Caractéristiques des copolymères P(PGA- <i>co</i> -GA- <i>co</i> -LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en solution avec la N,N-diméthylaminopyridine.....	123
Tableau II-5 Caractérisation des copolymères greffés par chimie "clic"	133
Tableau II-6 Détermination des CAC des copolymères greffés 11-2 et 11-3	138
Tableau II-7 Détermination des CAC des copolymères greffés 11-2 et 11-3	140
Tableau II-8 Comparaison des deux méthodes de préparation de nano-objets avec le copolymère 11-2, $F_{\text{graft}} = 15\%$, $f_{\text{OEG}} = 53\%$, $B = 1,6$	141

Tableau II-9 Encapsulation de la clofazimine par le copolymère 11-3.....	144
Tableau II-10 Encapsulation de la curcumine.....	147
Tableau III-1 Famille des polyméthacrylates.....	154
Tableau III-2 Caractérisation des polymères PLA(OH) ₂	158
Tableau III-3 Caractérisation des polymères PLA(Br) ₂	160
Tableau III-4 Caractérisation des copolymères tribloc P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -P(OEGMA)	163
Tableau III-5 Comparaison des conversions obtenues par RMN ¹ H et CES.....	167
Tableau III-6 Caractérisation des copolymères tribloc P(OEGMA)- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -P(OEGMA)	169
Tableau III-7 Caractérisations des copolymères tribloc avec OEGMA ₃₀₀ , OEGMA ₄₇₅ et OEGMA ₁₀₀₀ ...	174
Tableau III-8 Caractérisation des polymères PLA(OH) et PLA(Br)	177
Tableau III-9 caractéristiques des copolymères tribloc avec OEGMA 300, 475 et 1000 g.mol ⁻¹	178
Tableau III-10 Comparaison des compositions des copolymères peigne dibloc (8-1, 8-2 et 8-3) et tribloc (5-1, 5-2 et 5-3)	178
Tableau III-11 Détermination des concentrations critiques d'agrégation des copolymères peigne tribloc	180
Tableau III-12 Diamètres des copolymères tribloc.....	182
Tableau III-13 Encapsulation de la curcumine avec les systèmes peigne tribloc.....	188
Tableau III-14 Encapsulation de la curcumine avec les systèmes peigne dibloc.....	189
Tableau III-15 Cinétique de libération de la curcumine en pourcentage des systèmes 5-1 à 5-4 en fonction du temps	192
Tableau IV-1 Conditions et résultats de copolymérisation	204
Tableau IV-2 Caractérisation du copolymère HOOC-PEG- <i>b</i> -PLA(OH)	210

Introduction Générale

Le domaine biomédical et environnemental fait appel depuis plus de 60 ans à l'utilisation de polymères de synthèse. Dans le domaine biomédical plus particulièrement, des polymères de synthèses biocompatibles sont synthétisés et utilisés. Selon les applications concernées (permanentes ou temporaires) ces polymères peuvent être classés en deux catégories.

La première est constituée des polymères avec des structures stables, utilisés pour des dispositifs médicaux implantables (DMI tels que des treillis de soutènement ou des prothèses) biocompatibles mais non dégradables. En effet, ce genre de DMI doit conserver ses propriétés après implantation et avoir une durée de vie adéquate. La deuxième catégorie concerne les polymères avec des structures dégradables qui seront utilisés pour l'élaboration de DMI temporaires (ingénierie tissulaire, appareils orthopédiques, système de délivrance contrôlée de principes actifs), et dont les produits de dégradation peuvent être soit métabolisés, soit éliminés sans danger pour l'organisme. Dans les deux cas on parle de biomatériau.

Les critères minimum d'utilisation d'un tel biomatériau, selon Ikada et Tsuji, sont au nombre de quatre.¹ Le biomatériau devra être non toxique (c'est-à-dire ne pas présenter d'effet allergène, tératogène, etc.) Il devra également être stérilisable, quelle que soit la voie choisie, pour éviter d'induire une infection post-opératoire. Il devra enfin être biocompatible et biofonctionnel (c'est-à-dire montrant une efficacité particulière pour l'application visée).

L'utilisation des polyesters aliphatiques, et notamment le poly(acide lactique) (PLA), est déjà répandue pour la préparation de DMI temporaires grâce à leur dégradabilité et à leur biocompatibilité.¹⁻⁴ Cependant, leur utilisation est limitée dans certains cas à cause de leur structure hydrophobe. La formation de copolymères amphiphiles par introduction de poly(éthylène glycol) (PEG) hydrophile permettra de moduler les propriétés physico-chimiques des matériaux formés. Le PEG a déjà été largement utilisé pour la constitution de systèmes de délivrance de principes actifs (PA) grâce à ses propriétés physico-chimiques et biologiques incluant la biocompatibilité et le fait qu'il est éliminé par filtration rénale pour de faibles poids moléculaire.^{5,6} De plus, il est connu que le PEG, constituant une couronne hydrophile autour des nano-objets, forme une sorte de mur de défense, évitant –ou du moins retardant– ainsi l'adsorption de protéine et par conséquent, l'absorption non spécifique des nano-objets par le système réticuloendothélial (RES).^{7,8}

Ainsi, au cours des 20 dernières années, les copolymères amphiphiles constitués d'un bloc hydrophobe dégradable et d'un bloc hydrophile ont été largement étudiés pour des applications

biomédicales temporaires telles que la délivrance de PA.^{9–13} Parmi eux, les copolymères à blocs constitués de chaînes polyester aliphatique, tels que le PLA ou la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), liées à du PEG présentent des propriétés très intéressantes.^{14–21} En milieu aqueux, ces copolymères amphiphiles possèdent la faculté de s'auto-assembler, pour former des micelles constituées d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile.²² De telles micelles polymères avec une structure cœur-couronne présentent plusieurs avantages pour le transport et la libération de PA. En effet, ils permettent la solubilisation et l'encapsulation de PA hydrophobes au cœur du nano-objet. Ces systèmes permettent aussi le transport et donc la protection du PA ainsi que sa libération continue. Ils peuvent également améliorer son efficacité et réduire ses effets secondaires.²³ Les copolymères amphiphiles utilisés peuvent inclure une certaine vectorisation ou fonctionnalisation permettant une délivrance ciblée ou une modulation de l'activité thérapeutique *in vivo*.

Parmi les édifices pouvant être formés avec ces copolymères, l'essentiel des travaux ont été réalisés sur les copolymères à blocs linéaires de type dibloc et tribloc.^{24,25} Alexandridis met en évidence l'influence de la nature chimique des blocs sur les propriétés de ces copolymères à blocs amphiphiles, comme leur comportement dans un certain solvant.²⁶ Il existe des architectures macromoléculaires plus complexes constitués à partir de copolymères à blocs non linéaires comme les copolymères en étoile,^{27–29} les copolymères greffés ou peigne.^{18,30} Ces copolymères amphiphiles forment des objets différents dépendant non seulement de leur constitution mais également de leur architecture, notamment en milieu aqueux.

Dans ce cadre, notre travail s'est articulé autour de la synthèse et de la détermination des propriétés physico-chimiques en milieu aqueux de nouveaux copolymères greffés ou en peigne à base de PLA et de PEG. L'encapsulation et la libération de PA par de tels systèmes ont aussi été étudiées. Afin de nous placer dans des conditions aussi proches que possible des applications galéniques, les PA modèles choisis ont été la clofazimine et la curcumine ayant des propriétés thérapeutiques reconnues. Il s'est avéré que les différentes structures greffées synthétisées possèdent la faculté de s'auto-assembler et d'encapsuler ces PA et que leur structure impactent leur auto-assemblage.

1. Ikada, Y., Tsuji, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 117–132 (2000).
2. Albertsson, A. C., Varma, I. K. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules* **4**, 1466–1486 (2003).

3. Okada, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* **27**, 87–133 (2002).
4. Vert, M. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Die Angew. Makromol. Chemie* **166/167**, 155–168 (1989).
5. Greenwald, R. B., Choe, Y. H., McGuire, J., Conover, C. D. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 217–50 (2003).
6. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 347–60 (2003).
7. Vert, M., Domurado, D. Poly(ethylene glycol) : protein-repulsive or albumin-compatible? *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12**, 1307–1317 (2000).
8. Veronese, F. M., Pasut, G. PEGylation , successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today* **10**, 1451–1458 (2005).
9. Kataoka, K., Harada, a, Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 113–31 (2001).
10. Lutz, J. F., Borner, H. G. Modern trends in polymer bioconjugates design. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1–39 (2008).
11. Oerlemans, C. *et al.* Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm. Res.* **27**, 2569–89 (2010).
12. Grund, S., Bauer, M., Fischer, D. Polymers in Drug Delivery—State of the Art and Future Trends. *Adv. Eng. Mater.* **13**, B61–B67 (2011).
13. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2971–3010 (2012).
14. Riley, T. *et al.* Core - Shell Structure of PLA - PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery. *Langmuir* **19**, 8428–8435 (2003).
15. Venkatraman, S. S., Jie, P., Min, F., Freddy, B. Y. C., Leong-Huat, G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int. J. Pharm.* **298**, 219–232 (2005).
16. Ghoroghchian, P. P. *et al.* Bioresorbable vesicles formed through spontaneous self-assembly of amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules* **39**, 1673–1675 (2006).
17. Mikhail, A. S., Allen, C. Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(epsilon-caprolactone) micelles containing chemically conjugated and physically entrapped docetaxel: synthesis, characterization, and the influence of the drug on micelle morphology. *Biomacromolecules* **11**, 1273–80 (2010).
18. Zhang, W. *et al.* Amphiphilic Toothbrushlike Copolymers Based on Poly (ethylene glycol) and Poly (ε -caprolactone) as Drug Carriers. *Biomacromolecules* **11**, 1331–1338 (2010).

19. Yang, L., Qi, X., Liu, P., El Ghzaoui, A., Li, S. Aggregation behavior of self-assembling polylactide/poly(ethylene glycol) micelles for sustained drug delivery. *Int. J. Pharm.* **394**, 43–49 (2010).
20. Yang, L., El Ghzaoui, A., Li, S. In vitro degradation behavior of poly(lactide)-poly(ethylene glycol) block copolymer micelles in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **400**, 96–103 (2010).
21. Li, S. M., Yang, L., Wu, X. H., Liu, F., Duan, Y. R. Novel biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs. *Pharm. Res.* **26**, 2332–2342 (2009).
22. Wiradharma, N., Zhang, Y., Venkataraman, S., Hedrick, J. L., Yang, Y. Y. Self-assembled polymer nanostructures for delivery of anticancer therapeutics. *Nano Today* **4**, 302–317 (2009).
23. Mikhail, A. S., Allen, C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels. *J. Control. Release* **138**, 214–23 (2009).
24. Wei, X. *et al.* Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **381**, 1–18 (2009).
25. Xiao, R. Z. *et al.* Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 1057–1065 (2010).
26. Alexandridis, P. Amphiphilic copolymers and their applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1**, 490–501 (1996).
27. Giu, L., Wang, R., Zheng, C., Jin, Y., Jin, L. Q. β -cyclodextrin-centered star-shaped amphiphilic polymers for doxorubicin delivery. *Nanomedicine* **5**, 193–208 (2010).
28. Gou, P., Zhu, W., Shen, Z. Synthesis , self-assembly , and drug-loading capacity of well-defined cyclodextrin-centered drug-conjugated amphiphilic A14B7 miktoarm star copolymers based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules* **11**, 934–943 (2010).
29. Chen, S., Zhang, X.-Z., Cheng, S.-X., Zhuo, R.-X., Zhong, W. G. Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *Biomacromolecules* **9**, 2578–2585 (2008).
30. Du, J.-Z., Tang, L.-Y., Song, W.-J., Shi, Y., Wang, J. Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) side chains as drug carrier. *Biomacromolecules* **10**, 2169–74 (2009).

Chapitre I : Copolymères amphiphiles, composition, synthèse et auto-assemblage

Introduction

Les copolymères amphiphiles se définissent comme l'association, au sein d'une même molécule, de polymères à propriétés antagonistes, l'un (ou les uns) hydrophobe(s), l'autre (ou les autres) hydrophile(s), ce qui leur permet de former des auto-assemblages en milieu aqueux. Ce type de copolymères peut être obtenu à partir de la combinaison de blocs de polymères hydrophiles et hydrophobes. La synthèse de copolymères amphiphiles d'architectures variables apparaît de plus en plus intéressante, puisqu'elle permet de moduler finement les propriétés physico-chimiques des édifices formés en milieu aqueux. L'ensemble de ces facteurs (nature du polymère, masse molaire, architecture) leur permet d'adopter, en solution, une multitude de modes d'auto-assemblage différents avec des propriétés physico-chimiques différentes.¹

L'architecture du copolymère (Figure I-1) a des conséquences importantes sur la morphologie des auto-assemblages adoptés. Par exemple, un copolymère dit « à blocs » et un copolymère « greffé » formeront différents types d'auto-assemblages avec différentes propriétés.

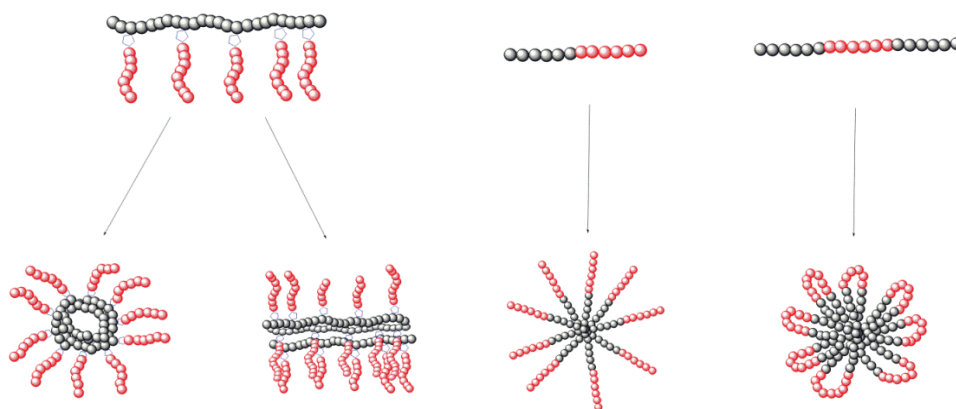


Figure I-1 Aperçu de quelques architectures obtenues par auto-assemblage

La morphologie des auto-assemblages dépend également d'autres facteurs comme la nature des polymères constituant le copolymère amphiphile et leurs masses molaires.

Les applications thérapeutiques concernées par l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles sont principalement la conception de systèmes de délivrance de principes actifs (PA). En fonction des paramètres listés précédemment (architecture, composition), les systèmes formés par l'auto-assemblage de différents copolymères amphiphiles n'auront pas les mêmes propriétés

d'encapsulation, de stabilisation et de transport d'un même PA. Pour les applications thérapeutiques, les copolymères amphiphiles à base de polyesters aliphatiques présentent l'avantage d'être biodégradables et biocompatibles.

Ce mémoire de thèse rend compte des travaux effectués afin de réaliser, à partir de polyesters aliphatiques et de polyéthers, des structures amphiphiles d'architectures variées. La description des différents copolymères amphiphiles synthétisés et de leurs propriétés d'encapsulation fera suite à des rappels bibliographiques divisés en quatre parties. La première définit les propriétés des polymères constituant les systèmes amphiphiles. La seconde décrit les méthodes existantes pour la synthèse de copolymères amphiphiles de différentes architectures. La troisième traite des propriétés d'auto-assemblage de tels copolymères. Enfin, l'aspect applicatif sera exposé, à savoir la conception de systèmes de délivrance de PA. Sera également abordée la modification chimique de tels systèmes pour leur conférer des propriétés de vectorisation permettant d'optimiser l'utilisation du PA et sa libération.

A. Composition de copolymères amphiphiles

Les copolymères amphiphiles sont composés d'au moins deux types de polymères ayant des propriétés antagonistes face à un même solvant, l'eau. En ce qui concerne les copolymères amphiphiles conçus pour la délivrance de PA, ils doivent être biocompatibles, et biodégradables ou éliminables.

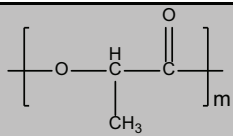
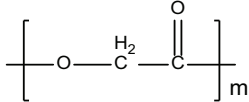
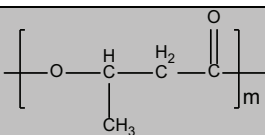
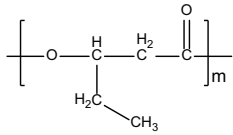
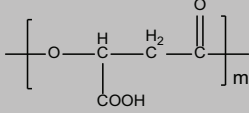
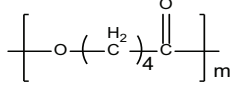
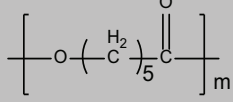
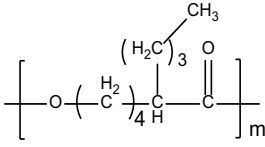
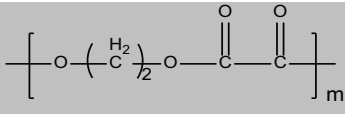
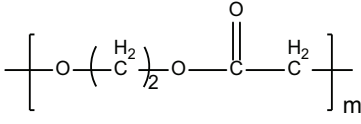
Un composé biodégradable sera défini selon Vert *et al.* comme un composé qui possède la capacité à être dégradé par une activité biologique.² De même, la notion de biocompatibilité sera définie comme la capacité d'un matériau à être utilisé dans une application donnée sans provoquer d'effets négatifs au sein du système vivant où il est utilisé. Deux grandes classes de polymères seront donc étudiées pour la conception de ces systèmes. La première sera constituée des polyesters aliphatiques, pour le ou les bloc(s) hydrophobe(s), car ils sont biodégradables et biocompatibles. La deuxième sera la famille des polyéthers pour la constitution des blocs hydrophiles car ils sont également biocompatibles et peuvent être éliminés par l'organisme.

1. Polyesters aliphatiques : biodégradables & hydrophobes

Parmi les polymères dégradables, les polyesters aliphatiques -dont les liaisons ester peuvent être hydrolysées- représentent une famille de polymères prometteuse pour les domaines biomédicaux et pharmaceutiques grâce à leurs propriétés de biocompatibilité et biodégradabilité.³⁻⁵

Le Tableau I-1 présente les structures des principaux polyesters aliphatiques utilisés à ce jour. À partir de ce tableau, les propriétés et caractéristiques de trois différents polyesters aliphatiques seront décrites, car ce sont des polymères largement utilisés dans le cadre des applications thérapeutiques telles que l'encapsulation de PA, à savoir le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL).

Tableau I-1 Liste des principaux polyesters aliphatiques employés

Type de polyesters	Polymère et acronyme	Structure du motif répétitif
Poly(α -hydroxyacides)	Poly(acide lactique) PLA	
	Poly(acide glycolique) PGA	
Poly(β -hydroxyacides)	Poly(hydroxybutyrate) PHB	
	Poly(hydroxyvalérate) PHV	
	Poly(β -acide malique)	
Poly(δ -hydroxyacides)	Poly(valérolactone) PVL	
Poly(ϵ -hydroxyacides)	Poly(ϵ -caprolactone) PCL	
	Poly(ϵ -décalactone) PDL	
Autres	Poly(1,4-dioxane-2,5-dione)	
	Poly(para-dioxanone)	

a. La poly(ϵ -caprolactone)

La PCL est un polyester semi-cristallin ($T_g \sim -60$ °C, $T_f \sim 60$ °C), résistant, flexible, biocompatible et biodégradable.⁶ Ce polymère est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du

monomère cyclique ϵ -caprolactone grâce à différents mécanismes (anionique, cationique, coordination, enzymatique). Actuellement, c'est le mécanisme de coordination qui est le plus utilisé car il permet d'avoir accès à des polymères de plus haute masse molaire comparé aux autres mécanismes.⁷

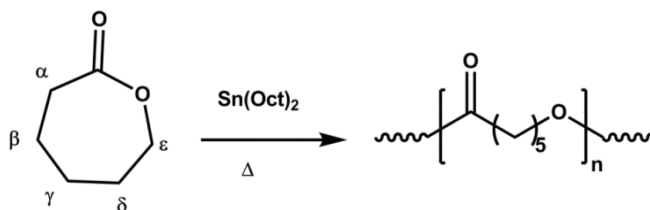


Schéma I-1 Voie d'obtention de la poly(ϵ -caprolactone) par polymérisation par ouverture de cycle

La PCL est un polymère produit industriellement (Tone®, Capa®) et possédant de nombreuses applications, notamment pour ses propriétés thermoplastiques et biocompatibles sans forcément en lien avec ses propriétés de biodégradabilité.

En revanche, lorsque les propriétés de biodégradabilité de la PCL sont utilisées, même si la vitesse de dégradation est rapide en présence de microorganismes, il apparaît que la PCL est plus difficilement hydrolysable dans l'organisme humain que les polyesters de type PLA ou PGA.⁸ De fait, elle se dégrade moins vite. En conséquence, la PCL sera préférée pour la confection de matériaux plastiques pour l'environnement ou de matériaux implantables à longue durée de vie, tels que des fils de suture résorbables ou encore pour la confection de stents et plus récemment dans l'ingénierie tissulaire.^{9,10,11}

Néanmoins, son utilisation ne se limite pas à la confection de matériaux implantables. Conjugués à des polymères hydrophiles, la PCL est également utilisée pour la conception de micelles, vésicules et/ou polymersomes pour la délivrance de PA.¹² De plus, la possibilité de fonctionnaliser le monomère à l'origine de la PCL - au niveau des positions α et γ - permettra d'obtenir une PCL fonctionnalisée aux propriétés modifiées (Schéma I-1).

b. Le poly(acide lactique)

Le poly(acide lactique) (PLA) est un polyester aliphatique linéaire issu de ressources renouvelables (fermentation de l'amidon de maïs par exemple) présentant des propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité lui conférant un attrait particulier pour de nombreuses applications.^{13,14} Il fait partie de la famille des thermoplastiques et présente également des propriétés mécaniques et thermiques attrayantes.¹⁵ Le PLA peut être obtenu, comme la PCL, par polymérisation par ouverture de cycle

(ROP) à partir du monomère L ou D-lactide (Schéma I-2) selon différents mécanismes qui seront décrits ultérieurement.

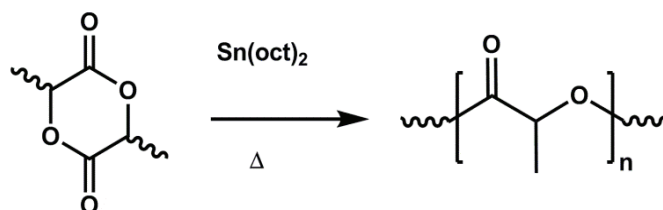


Schéma I-2 Voie d'obtention du poly(acide lactique) par ROP¹⁶

Le lactide existe sous trois formes en raison de la présence de centres asymétriques dans sa structure. Il pourra donc donner lieu à la formation de trois différents stéréoisomères : le L, le D et le MESO-lactide qui correspondent respectivement aux conformations R,R ; S,S et R,S.¹⁷

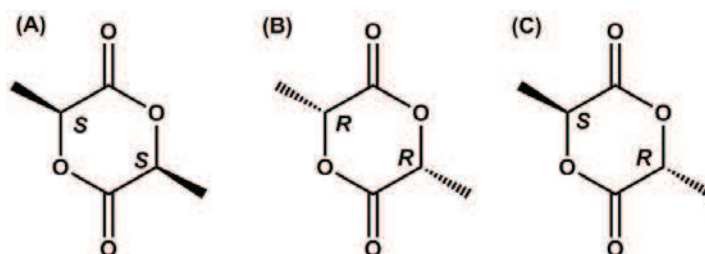


Schéma I-3 structures des stéréoisomères du lactide : (A) l-lactide; (B) d-lactide; (C) meso-lactide

Les monomères commerciaux existant aujourd'hui sont le L-lactide, le D-lactide et le D,L-lactide qui est un mélange racémique de D et de L-lactide. Lors du processus de polymérisation par ouverture de cycle, la polymérisation d'un des monomères ou la copolymérisation des deux conféreront au squelette du polymère des propriétés différentes.¹⁸ En se référant à la nomenclature de Vert *et al.*¹⁹, on écrira PLA_x avec x désignant la teneur en L-lactide dans le polymère. Ainsi un PLA₁₀₀ sera un homopolymère constitué à 100 % de L-lactide. Un PLA ayant une proportion en L-lactide et en D-lactide de 50 % sera noté PLA₅₀. La notation est importante car elle révèle la composition énantiomérique du PLA. Celle-ci contribue à modifier les propriétés mécaniques, thermiques et de dégradation. Un PLA₁₀₀ sera semi-cristallin, alors qu'un PLA₈₅ sera amorphe influant ainsi sur les propriétés physico-chimiques comme la dégradation.

Le PLA est donc un polymère dont la biodégradabilité peut être modulée en fonction de sa composition, et cette particularité représente un attrait supplémentaire pour son utilisation dans la conception de biomatériaux. L'hydrolyse du PLA par l'action d'estérases mène à la formation d'acide lactique. Cette molécule est un sous-produit formé par le métabolisme du corps humain en

anaérobie. Elle est également incluse dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) permettant au final son excretion du corps sous forme de dioxyde de carbone et d'eau.²⁰

Grâce à toutes ces propriétés, le PLA est largement utilisé pour des applications biomédicales. On le retrouve notamment combiné avec le poly(acide glycolique) (PGA), formant le poly(acide lactique-co-acide glycolique), sous l'acronyme PLAGA. Ce type de combinaison permet la formation de systèmes de nanoparticules pour la délivrance de PA.^{21,22} La même nomenclature, que celle évoquée par Vert *et al.* sera retrouvée avec l'apparition du terme GA correspondant à la teneur en motifs acide glycolique au sein du copolymère. Ainsi un PLA₃₀GA₄₀ correspondra à une composition en motifs glycolique de 40% et 30% de chacun des stéréoisomères.²³

c. Le poly(acide glycolique)

Le PGA, polyester semi-cristallin qui possède des propriétés de biocompatibilité similaires au PLA, peut lui aussi être obtenu par polymérisation par ouverture de cycle à partir du monomère cyclique glycolide (Schéma I-4). Ce polymère est également issu de ressources renouvelables, puisque le monomère peut être synthétisé à partir de la fermentation de betterave, de canne à sucre ou de raisin.

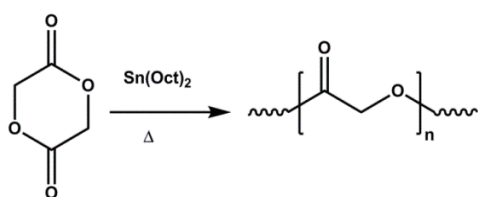


Schéma I-4 Voies d'obtention du poly(acide glycolique)

Ce polymère peut être utilisé pour la fabrication de fils de suture résorbables, mais son utilisation en tant qu'homopolymère est limitée à cause de son instabilité hydrolytique. C'est pourquoi cette sous-unité est généralement employée sous forme de copolymère.^{22,24}

En prenant l'exemple du PLAGA évoqué précédemment, qui résulte d'une copolymérisation des monomères cycliques lactide et glycolide, ce copolymère démontre de meilleures propriétés de biodégradabilité pour la synthèse d'implants chirurgicaux et la libération de PA.²⁵ En effet, le PLA et le PGA ayant des propriétés physico-chimiques similaires, ils peuvent être utilisés conjointement. Leur copolymérisation donnera lieu à un copolymère où la proportion en unités acide glycolique influera sur la cristallinité et la vitesse de dégradation.

Le Tableau I-2 regroupe les différentes caractéristiques des polymères en fonction de leur nature et de leur composition.

Tableau I-2 Caractéristiques des polyesters aliphatiques

Polymère	Point de fusion	Tg	Module d'Young	Elongation	Temps de dégradation
	°C	°C	Gpa	%	mois
PGA	225-230	35-40	>7,0	15 à 20	6 à 12
PCL	55-65	-65- -60	0,2 à 0,34	300 à 500	>24
PLLA	170-180	60-65	2,8 à 4,0	3 à 10	>24
PDLLA	Amorphe	45-55	1,4 à 2,7	3 à 10	12 à 16
PLA₈₅GA₁₅	Amorphe	45-52	1,4 à 2,8	3 à 10	5 à 6
PLA₇₅GA₂₅	Amorphe	45-52	1,4 à 2,8	3 à 10	4 à 5
PLA₆₅GA₃₅	Amorphe	45-50	1,4 à 2,8	3 à 10	1 à 2

d. Synthèse des polyesters aliphatiques par polymérisation par ouverture de lactones

La voie de synthèse générale pour l'obtention de copolyesters aliphatiques est la polymérisation par ouverture de cycle (ROP), les monomères de départ étant des lactones. Ces polyesters aliphatiques peuvent également être préparés par polycondensation. Cependant, cette méthode fournit généralement des polyesters avec des dispersités élevées et des masses molaires souvent faibles. Comme l'évoquent Jérôme *et al.*,²⁶ la polymérisation par ouverture de cycle de ces monomères cycliques est catalysée et amorcée par une multitude de systèmes catalytiques qui peuvent être divisés en trois catégories : les systèmes métalliques, les systèmes non-métalliques et les systèmes enzymatiques. Les deux premières catégories seront décrites ci-dessous.

i. Catalyseurs métalliques

La polymérisation par ouverture de cycle peut être initiée en utilisant des catalyseurs métalliques. L'espèce active est un complexe métal-alcoolate qui peut être soit pré-synthétisé, soit généré *in situ*. La polymérisation se produit selon un processus de coordination-insertion. De nombreux mécanismes sont proposés à ce jour. Le Schéma I-5 présente un des mécanismes. Selon ce mécanisme, le processus de polymérisation implique l'amorceur en tant que nucléophile, et la dilactone en tant qu'agent électrophile. Selon les données de la littérature, il semblerait que l'oxygène du carbonyle de la lactone se coordonne au métal en créant une liaison métal-oxygène.²⁷ L'amorceur s'insère ensuite et réorganise la structure pour ouvrir la lactone. Une fois la lactone ouverte, le même processus a lieu entre le catalyseur et le monomère suivant; seulement au lieu de

l'amorceur, ce sera la chaîne en croissance qui viendra s'insérer sur le monomère. En fin de polymérisation, le métal présent en bout de chaîne pourra être séparé par hydrolyse.

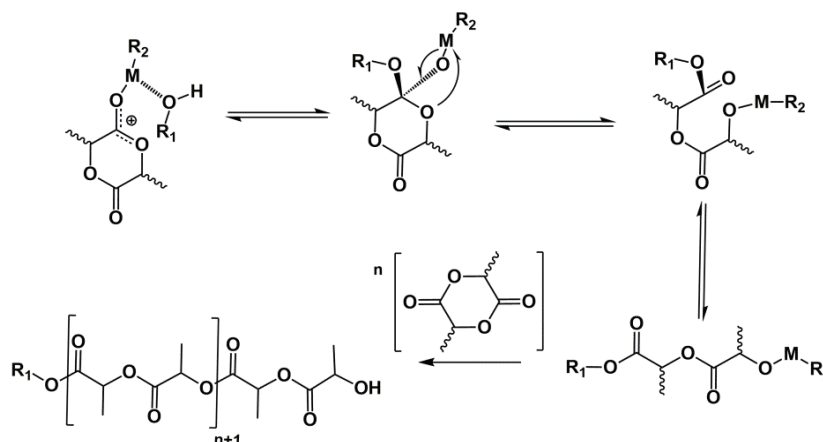


Schéma I-5 Polymérisation par ouverture de cycle du lactide avec le mécanisme supposé de coordination-insertion²⁷

De nombreux travaux ont été réalisés avec des systèmes métalliques à base de métaux de transition des groupes II, III et IV de la classification périodique. On citera les atomes d'aluminium et de zinc²⁹⁻³³ mais également des travaux utilisant l'étain.^{28,34-39} Parmi les différents catalyseurs métalliques utilisés, l'octoate d'étain (2-éthyl hexanoate d'étain, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$) est le plus décrit dans la littérature en raison de ses nombreux avantages (Schéma I-6). Premièrement, il a une activité catalytique très importante qui permet de préparer des polyesters de hautes masses molaires avec de faibles dispersités (\mathcal{D}_M). Son utilisation a permis de réduire les temps de réaction entre 1 heure et 24 heures et réduire les réactions secondaires telles que la transestérification. Il est également soluble dans la majorité des lactones, ce qui permet son utilisation pour des polymérisations en masse. De plus, il est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) depuis 1996,^{26,40,41} et peut donc être employé dans la préparation de polymères à usage thérapeutique sans altérer leur biocompatibilité.³⁸ Des amorceurs sont ajoutés au milieu réactionnel pour polymériser les différents monomères et être en mesure de déterminer la masse molaire du copolymère.

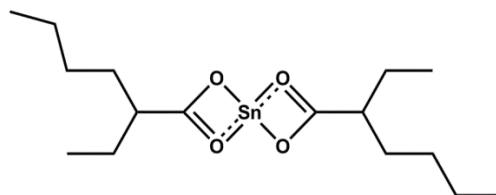


Schéma I-6 Octoate d'étain ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)

Plus récemment, des systèmes à base de calcium, magnésium, fer et zinc ont été étudiés pour tenter de remplacer l'étain.⁴² Le principal avantage de ces métaux est qu'ils sont déjà présents dans l'organisme.^{43,44}

Ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur la polymérisation de ces lactones cycliques, notamment par Deng *et al.* en utilisant des lanthanides, mais la rareté de ces métaux représente un frein à l'utilisation de tels systèmes.⁴⁵⁻⁴⁸

ii. Catalyseurs organiques

Depuis près d'un siècle maintenant, l'organocatalyse est utilisée pour la synthèse de petites molécules de manière énantiosélective, ce qui permet de se rapprocher de l'efficacité des réactions catalysées par des enzymes.⁴⁹ De récentes études ont démontré que ces catalyseurs organiques pouvaient également être appliqués à la synthèse de polymères et permettaient un bon contrôle des conditions de réactions. De plus, l'avantage principal est de ne pas utiliser de métaux.⁵⁰ Ainsi, une nouvelle famille de catalyseurs s'est largement développée pour la polymérisation de lactones au cours des dix dernières années. Parmi tous les catalyseurs organiques, on peut noter différentes sous-catégories de molécules (Tableau I-3) : les amines basiques, les carbènes N-hétérocycliques (NHC), les complexes bifonctionnels utilisant l'urée ou la thiourée et les guanidines, amidines et phosphines.⁵⁰

Tableau I-3 Catalyseurs organiques

	Amines basiques	Carbènes N- hétérocycliques	Urée	Thiourée	Guanidine	Amidine
Molécule						

La première approche organocatalytique a été rapportée en 2001 avec la sous-catégorie des amines basiques de Lewis incluant la famille des pyridines avec la 4-dialkylaminopyridine ou *N,N*-diméthylamino-4-pyridine (DMAP) et la 4-pyrrolidinopyridine (PPY).^{51,52}

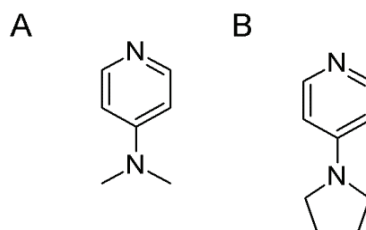


Schéma I-7 Famille des pyridines (A) *N,N*-diméthylaminopyridine (B) 4-pyrrolidinopyridine

La DMAP ou la *N,N*-diméthylaminopyridine est utilisée comme alternative aux catalyseurs métalliques. Il s'agit d'une version plus « écologique » permettant de générer des polymères de hautes masses molaires tout en travaillant avec des conditions plus douces. La température passe notamment de 80°C pour un système catalysé à l'étain en solution à 35°C pour un système catalysé avec la DMAP et des temps de réaction allant de 20 à 96 heures.^{53,54} Le seul inconvénient de ce type de catalyseur repose sur les quantités initiales de catalyseur à introduire. Généralement, plus les masses molaires élevées seront visées, plus le nombre d'équivalents de catalyseur devra augmenter. Cependant, il s'agit d'un problème mineur, car l'intégralité du catalyseur pourra être éliminé en fin de réaction par simple précipitation dans du méthanol.

Plusieurs mécanismes sont proposés à ce jour. Le premier suppose que la DMAP possède juste le rôle de base forte. Le deuxième implique que la DMAP agisse comme un catalyseur bifonctionnel avec un atome d'azote électrophile et un atome d'hydrogène en position ortho formant une liaison hydrogène. Ainsi, le catalyseur « attaque » le monomère cyclique et forme un intermédiaire acylpyridinium.^{55,51}

Deux des mécanismes proposés sont indiqués dans le Schéma I-8.

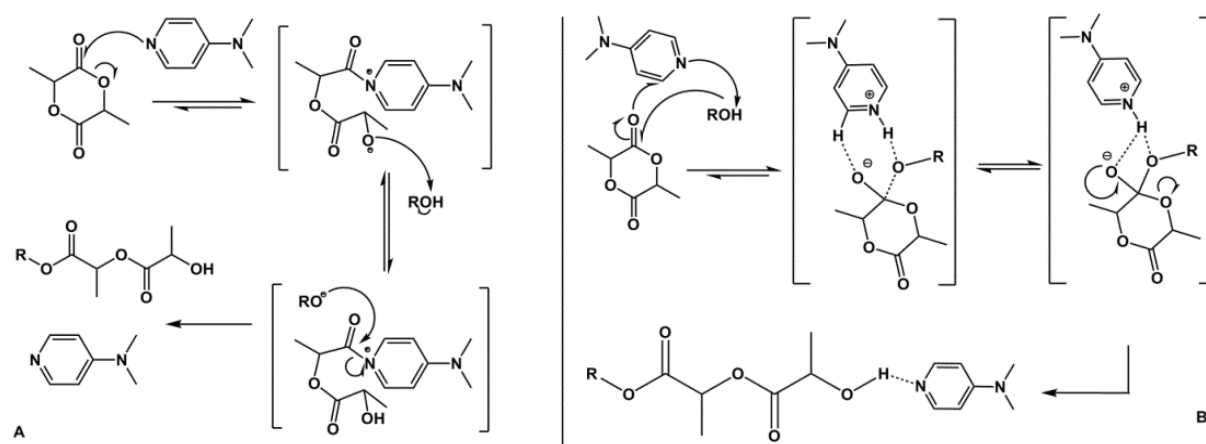


Schéma I-8 (A) Mécanisme Nucléophile; (B) Mécanisme bifonctionnel

La sous-catégorie suivante regroupe les carbènes *N*-hétérocycliques (NHC) (Tableau I-3). Leur utilisation découle des travaux de Breslow et Wanzlick dans les années 60, qui ont démontré que les NHC pouvaient se comporter comme des catalyseurs nucléophiles en étant facilement fonctionnalisables.^{49,56,57} En cela, les carbènes *N*-hétérocycliques démontrent une activité catalytique supérieure à la famille des pyridines. Mais le processus de polymérisation par ouverture de cycle, a besoin d'un groupement nucléophile et d'un groupement électrophile, c'est là qu'intervient la sous-

catégorie suivante : les catalyseurs organiques bifonctionnels de type urée et thiourée (TU) (Tableau I-3).⁵⁸

Ceux-ci, combinés avec une amine, activent simultanément l'amorceur et le monomère, permettant l'obtention de polymères de haute masse molaire, de manière contrôlée mais avec des cinétiques de polymérisation plus lentes que pour les NHC.

La dernière sous-catégorie est constituée des guanidines, comme le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]déc-1-ène (TBD), et des amidines telles que le 1,8-diazabicycloundéc-7-ène (DBU) (Schéma I-9).

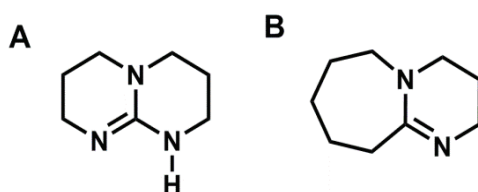


Schéma I-9 (A) Triazabicyclo[4.4.0]déc-1-ène (B) 1,8-Diazabicycloundéc-7-ène

Ces catalyseurs sont considérés comme des « superbases ».⁵⁹⁻⁶² Celles-ci démontrent une activité catalytique très forte avec des cinétiques très rapides pour la polymérisation du lactide dans un solvant apolaire et à température ambiante. Cependant, quelques inconvénients entourent l'utilisation de ce type de catalyseurs. En effet, la sélectivité des catalyseurs face à d'autres monomères est trop importante, puisque la valérolactone ou la caprolactone ne seront pas polymérisées par la 1,8-diazabicycloundéc-7-ène ou le méthyl-1,8-diazabicycloundéc-7-ène (MTBD) sans la présence de thiourée comme co-catalyseur.

Au final, les polyesters comme le PLA, la PCL ou le PGA peuvent être obtenus aisément par polymérisation par ouverture de cycle en choisissant le système catalytique convenant à l'application ou la stratégie chimique visée.

2. Polyéthers : bioéliminables & hydrophiles

La plupart des polyéthers sont des polymères hydrophiles et biocompatibles. Ils peuvent être couplés à des polymères hydrophobes pour générer des copolymères amphiphiles à blocs et faciliter ainsi la solubilisation en milieu aqueux des copolymères formés. Le Tableau I-4 présente les structures les plus courantes de la famille des polyéthers.

Tableau I-4 polyéthers courants employés

Polymère et acronyme	Schéma du motif répétitif
Poly(éthylène glycol) ou PEG	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_p$
Poly(propylène glycol) ou PPG	$\left[\text{O}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_2 \right]_p$
Poly(tétraméthylène glycol) ou PTMG	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_p$

Les polyéthers sont obtenus par polymérisation par ouverture de cycle anionique ou cationique d'éthers cyclique tel que l'oxyde d'éthylène, l'oxyde de propylène ou encore le tétrahydrofurane pour obtenir respectivement le poly(éthylène glycol) (PEG), le poly(propylène glycol) (PPG) et le poly(tétraméthylène glycol) (PTMG).

Dans les deux cas, on parle de polymérisation vivante. La croissance des chaînes et l'architecture au cours de la polymérisation sont contrôlées par trois critères :

- Phase d'amorçage rapide
- Croissance simultanée pour chaque chaîne
- Pas de réaction de transfert ou de terminaison

Ce genre de polymérisation fournit des polymères avec une distribution en masse très étroite ($\bar{M}_w/\bar{M}_n < 1,05$), sous réserve de travailler dans des solvants apolaires et en milieu anhydre pour éviter la contamination du milieu. La réaction de polymérisation s'interrompt lorsque tous les monomères sont consommés, mais les extrémités de chaînes restent actives jusqu'à l'ajout d'un agent de terminaison comme un alcool.

Parmi les polyéthers, le PEG est sans doute le plus utilisé. Les avantages relatifs à son utilisation sont nombreux. Il est biocompatible, inodore, inerte vis-à-vis de beaucoup d'agents chimiques et s'avère également non toxique. De plus, de nombreux PEG de masses molaires variables sont disponibles commercialement tout en gardant un faible coût.⁶³

Il est également autorisé par la FDA et est donc reconnu comme utilisable pour des applications biomédicales comme la confection de système de délivrance de PA.⁶⁴ À la différence des polyesters, le PEG n'est pas biodégradable, car il est insensible à l'hydrolyse, mais peut cependant être éliminé par filtration rénale (sous condition d'une masse molaire inférieure à 20 000 g.mol⁻¹); il est donc considéré comme bioéliminable.

Les avantages de l'utilisation du PEG pour la conception de systèmes amphiphiles ne résident pas seulement dans sa faculté à apporter de l'hydrophilie. Il apporte également au système des capacités de furtivité en donnant un temps de circulation *in vivo* plus long en prévenant l'adsorption des protéines et des macrophages à la surface des nano-objets en solution.⁶⁵

B. Synthèse de copolymères amphiphiles à base de polyester

La définition même d'amphiphilie, comme introduite précédemment (amphi signifiant « double » et phile signifiant « aimer ») met en évidence le fait que la molécule globale possèdera des groupements ayant des affinités opposées pour un même solvant. En chimie générale, on parlera de tensioactifs lorsqu'on se trouve en milieu aqueux. Les tensioactifs comprennent une tête hydrophile et une ou plusieurs queues hydrophobes et présentent des propriétés particulières d'adsorption aux interfaces et des propriétés d'auto-assemblage. Dans le « monde » des polymères, le terme de macromolécule amphiphile a fait son apparition. Il représente l'association de deux (ou plus) polymères de nature différente.⁶⁶

De nombreuses stratégies existent pour synthétiser des copolymères amphiphiles. Les différentes architectures pouvant être obtenues (copolymères à blocs, greffés, en étoile etc.) seront décrites dans ce chapitre.

1. Copolymères à blocs

Dans les copolymères à blocs à base de polyesters et de polyéthers, il existe une multitude de sous-catégories ; des dibloc (1 bloc hydrophobe, 1 bloc hydrophile) et tribloc et jusqu'aux multiblocs. Chacune de ces différentes architectures va être obtenue différemment et sera décrite dans la partie suivante.

a. Copolymères dibloc

Les copolymères amphiphiles linéaires de type dibloc sont constitués d'une entité hydrophile et d'une entité hydrophobe. Dans notre cas, ils seront composés d'un bloc PLA, PCL ou PLAGA et d'un autre bloc PEG. L'obtention de ces copolymères dibloc se fait selon différentes stratégies. La Figure I-2 présente les différentes stratégies employées et décrites dans cette partie.

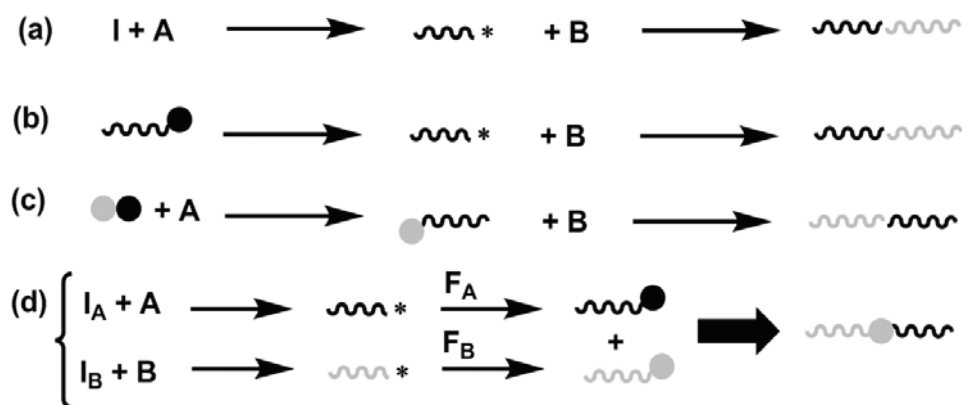


Figure I-2 Représentation schématique des stratégies de synthèse de copolymères dibloc

(a) addition séquentielle de monomère ; (b) modification du bout de chaîne ; (c) amorceur difonctionnel ; (d) couplage de polymères ω fonctionnalisés préformés.

I : Amorceur ; F : agent de fonctionnalisation ; * : site actif

i. Polymérisation séquentielle des monomères.

Il a été établi précédemment que les monomères cycliques tels que l'oxyde d'éthylène ou le lactide pouvaient être polymérisés par ouverture de cycle. Un copolymère dibloc peut donc être obtenu à partir de la ROP anionique ou cationique de différents monomères. Le Schéma I-10 présente la polymérisation anionique séquentielle de l'oxyde d'éthylène et de lactones.⁶⁷ Ce genre de polymérisation a lieu en une seule étape, « one-pot », dans le même milieu, sans besoin de modifier les conditions expérimentales (Figure I-2, stratégie a). Les conditions requises pour cette stratégie sont au nombre de deux. Premièrement, il est important que le macro-anion formé soit suffisamment nucléophile pour amorcer la polymérisation du deuxième monomère, ensuite la phase d'amorçage doit être plus rapide que la propagation du second monomère.⁶³

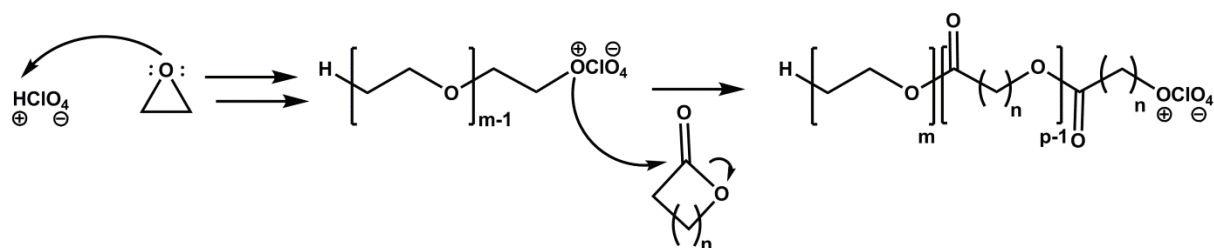


Schéma I-10 Synthèse d'un copolymère dibloc PEG-*b*-polyester⁶⁷

Une variante de cette stratégie utilise un PEG monofonctionnel préformé comme macroamorceur (Schéma I-11). La fonction hydroxyle terminale du PEG est utilisée pour amorcer la polymérisation des lactones et ainsi obtenir des copolymères dibloc amphiphiles.⁶⁸

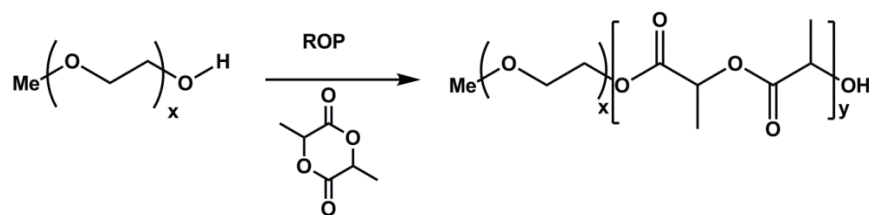


Schéma I-11 Synthèse d'un copolymère dibloc PLA-b-PEG⁶⁸

ii. *Modification de la fonction terminale sur un polymère préformé*

Une autre alternative pour la création de copolymères à blocs linéaires est la modification chimique d'une extrémité de chaîne d'un polymère préformé (Figure I-2, stratégie b). En effet, il faut convertir le site de propagation du premier bloc en un amorceur approprié capable d'initier la polymérisation du second monomère. Ainsi, l'extrémité d'un squelette PLA, PCL ou PLAGA préformé, peut être modifiée pour obtenir une fonction capable d'initier la polymérisation radicalaire contrôlée (CRP) de monomères de type méthacrylate porteur du groupement R que l'on souhaite.⁶⁹

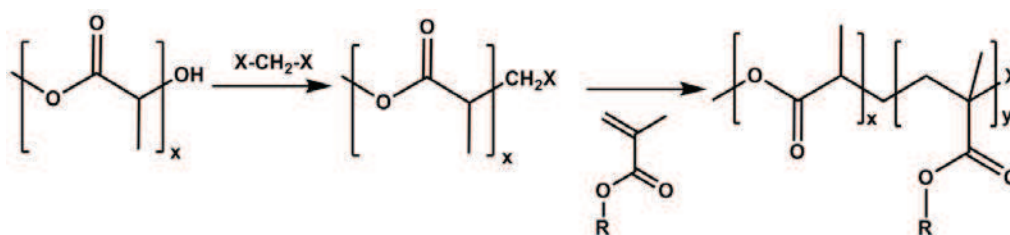


Schéma I-12 Obtention de copolymères dibloc par la modification chimique des bouts de chaîne⁶⁹

Cependant, il est important de noter que l'obtention de copolymères dibloc de ce type ne fournit pas de squelette biodégradable.

iii. *Utilisation d'un amorceur difonctionnel asymétrique*

Des copolymères dibloc peuvent être également préparés en utilisant des amorceurs difonctionnels asymétriques dits « dual » (Figure I-2, stratégie c). Cette méthode utilise des amorceurs avec deux sites d'amorçages différents. Ces deux sites sont capables d'amorcer simultanément la polymérisation de deux monomères de natures différentes par des techniques de polymérisation différentes. Les deux sites actifs doivent se tolérer et être compatibles. Ainsi, comme le rapportent Saeed *et al.*, il est possible de synthétiser un copolymère dibloc amphiphile à base de polyester et de poly(méthacrylate) en utilisant un amorceur approprié (Schéma I-13).⁷⁰

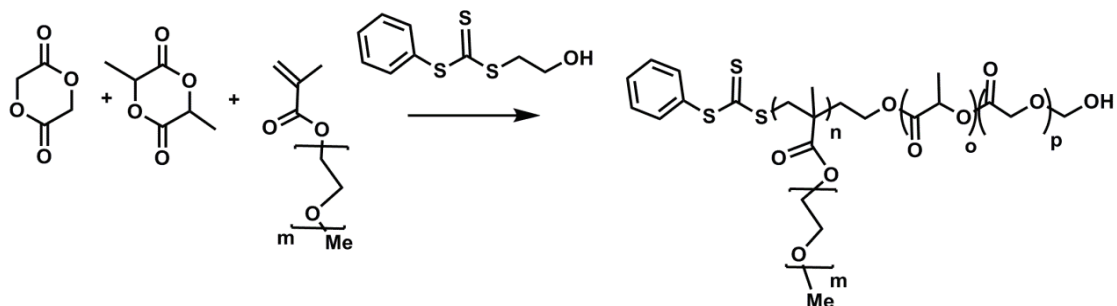


Schéma I-13 Synthèse d'un copolymère dibloc amphiphile à partir d'un amorceur difonctionnel⁷⁰

Ici, un amorceur difonctionnel - contenant dans sa structure un agent de transfert de chaîne (CTA) et une fonction hydroxyle - est utilisé simultanément en polymérisation radicalaire de type RAFT et en ROP pour amorcer la polymérisation des monomères lactide, glycolide et méthacrylate de poly(éthylène glycol) pour former des copolymères dibloc amphiphiles.

iv. Préparation de deux polymères fonctionnalisés et couplage

La dernière méthode consiste à synthétiser des homopolymères séparément, puis à les coupler par ligation. Pour cela, un amorceur difonctionnel est souvent utilisé. Il initie la polymérisation d'un monomère d'un côté, tandis qu'il permet une réaction de ligation avec un autre bloc post-polymérisation. Différents blocs peuvent être couplés en faisant réagir les fonctions présentes sur les amorceurs (Figure I-2, stratégie d).

Une technique de couplage courante est la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre entre un polymère fonctionnalisé par une triple liaison et un polymère fonctionnalisé par un azoture.⁷¹ Grégory *et al.* ont démontré qu'ils pouvaient étendre cette stratégie à de nombreux polymères pouvant être obtenus par polymérisation radicalaire contrôlée.⁷²

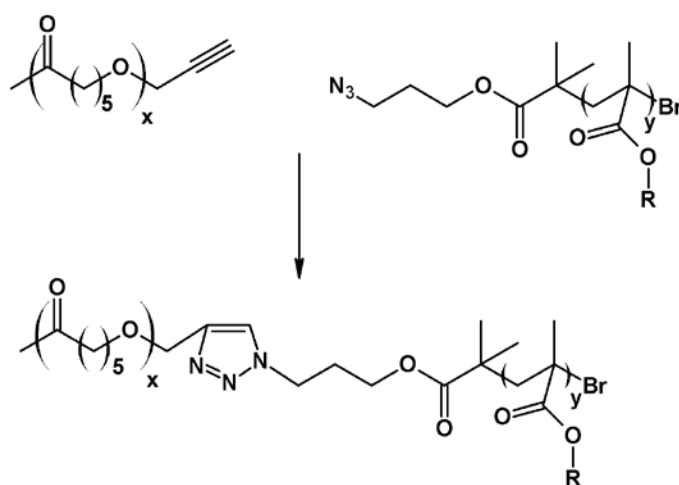


Schéma I-14 Couplage par chimie "clic" entre de la PCL et du poly(méthacrylate)

Le Schéma I-14 présente le couplage entre un bloc PCL amorcé par l'alcool propargylique et un bloc poly(méthacrylate) fonctionnalisé par une fonction azoture en extrémité de chaîne. La stratégie est modulable et permet de former un copolymère dibloc de manière régiosélective.⁷³ Le problème inhérent à cette stratégie est que, même si la réaction a un taux d'efficacité élevé, le rendement est généralement faible car les étapes de purification sont délicates. Un des blocs étant introduit en excès, son élimination après réaction est difficile et diminue le rendement.

b. Copolymères tribloc

Les copolymères tribloc amphiphiles de type ABA ou BAB, où A est le polymère hydrophile et B le polymère hydrophobe, sont les copolymères à blocs les plus simples. En fonction de la nature des blocs et de la technique de polymérisation, les stratégies de synthèse évoquées précédemment seront adaptées (Figure I-3).

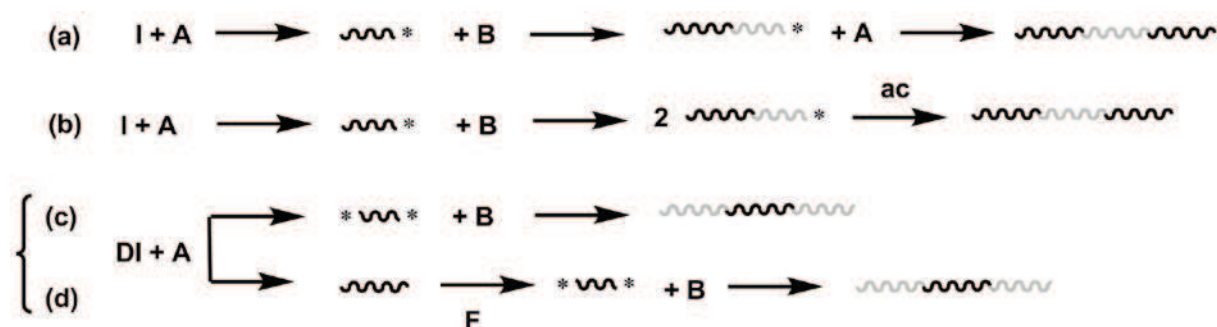


Figure I-3 Représentation schématique des stratégies de synthèse de copolymères tribloc

(a) addition séquentielle de monomères ; (b) utilisation d'un agent de couplage ; (c) et (d) couplage ou polymérisation à partir d'un polymère téléchélisé α,ω fonctionnalisé

I : Amorceur ; F : agent de fonctionnalisation ; * :site actif ; ac : agent de couplage ; DI : amorceur difonctionnel

On notera que les deux premières stratégies (a) et (b), correspondant respectivement à une polymérisation séquentielle des monomères et à la synthèse d'un copolymère dibloc puis à l'utilisation d'un agent de couplage (Figure I-3) restent rares. Les stratégies (c) et (d) en comparaison sont plus largement utilisées.

i. Polymérisation séquentielle des monomères

De manière similaire au copolymère dibloc, les copolymères tribloc peuvent être obtenus par polymérisation séquentielle de différents monomères (Figure I-3, stratégie a). Cependant, comme cela a été évoqué lors de la synthèse de copolymères dibloc, l'ordre d'addition et de polymérisation des monomères est important si l'on veut contrôler le procédé. Cette technique est souvent délicate à mettre en place en mode « one-pot », à moins que les monomères ne possèdent à peu près la même réactivité. Zhao *et al.* rapportent cependant la synthèse de tribloc de type ABA par addition

séquentielle des monomères éthylène oxyde, ϵ -caprolactone et éthylène oxyde en « one-pot » sans modifier le milieu réactionnel.⁶⁷

ii. Synthèse d'un copolymère dibloc et couplage

Pour la synthèse de tribloc de type ABA, et dans le cas où le polymère B ne peut pas polymériser le monomère A, l'autre alternative reste de synthétiser le copolymère dibloc AB, puis d'ajouter un agent de couplage, permettant au bloc B de se retrouver au centre.

He *et al.* rapportent la synthèse d'un dibloc à partir du poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(acide lactique). Puis, le dibloc est mis en présence d'un agent de couplage, l'hexaméthylène diisocyanate (HMDI), qui permet, selon le Schéma I-15, d'obtenir le copolymère tribloc de type ABA.⁷⁴

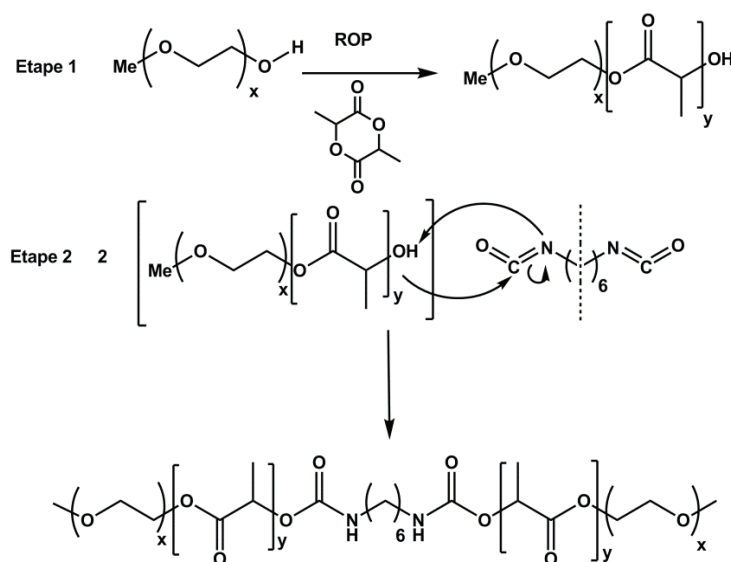


Schéma I-15 Synthèse d'un copolymère tribloc PEG-*b*-PLA-*b*-PEG par couplage

iii. Couplage à partir de polymères téléchéliques α,ω fonctionnalisés

La stratégie la plus répandue pour la synthèse de copolymères tribloc de type BAB (ou ABA) utilise un bloc central A (ou B) téléchélique α,ω fonctionnalisé. Le bloc central téléchélique est généralement obtenu à partir de la polymérisation du monomère A avec un amorceur difonctionnel symétrique. Ensuite, deux méthodologies sont appliquées.

Dans le cas où les extrémités de chaînes du bloc central sont des sites actifs, le monomère B est ajouté et polymérisé, pour former le tribloc BAB (Figure I-3, stratégie c). Comme le démontrent plusieurs équipes, cette stratégie peut être appliquée aux fonctions hydroxyle terminales d'un α,ω -dihydroxy-poly(éthylène glycol). Celles-ci servent de sites actifs pour la polymérisation par ouverture de dilactones cycliques comme le lactide.⁷⁵⁻⁷⁸ Le bloc PEG est à lui seul un macroamorceur difonctionnel.

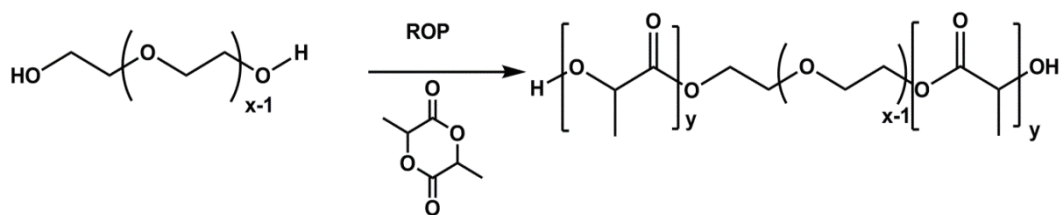


Schéma I-16 Synthèse de copolymères tribloc PLA-*b*-PEG-*b*-PLA de type BAB

Dans le cas où le polymère préformé n'est pas en mesure d'initier la polymérisation des monomères, la deuxième méthodologie est appliquée (Figure I-3, stratégie d). Celle-ci repose sur la modification des extrémités de chaînes du polymère préformé.

Plusieurs équipes rapportent la synthèse de copolymères tribloc de type ABA où le bloc B téléchélique est obtenu à partir de l'utilisation d'un amorceur difonctionnel. Ensuite, les extrémités de chaînes sont modifiées pour amorcer la polymérisation radicalaire de monomères méthacrylate (Schéma I-17 et Schéma I-18).^{79,80}

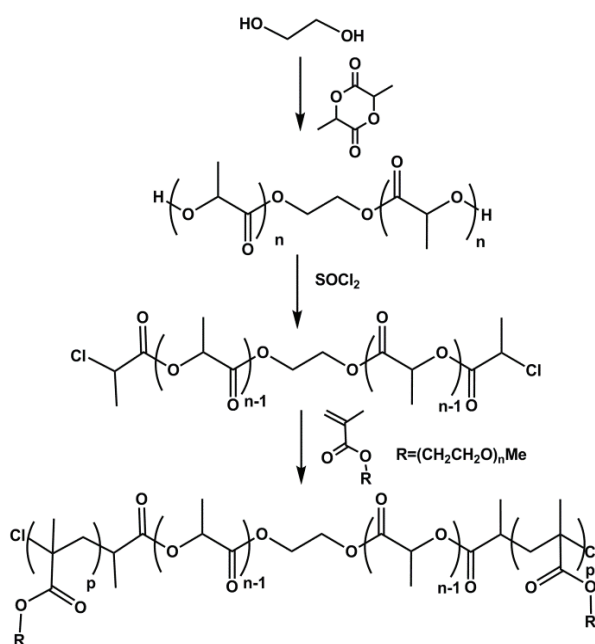


Schéma I-17 Synthèse de copolymères tribloc de type ABA PEGMA-*b*-PLA-*b*-PEGMA à partir d'un amorceur difonctionnel et d'un macroamorceur PLA α,ω fonctionnalisé

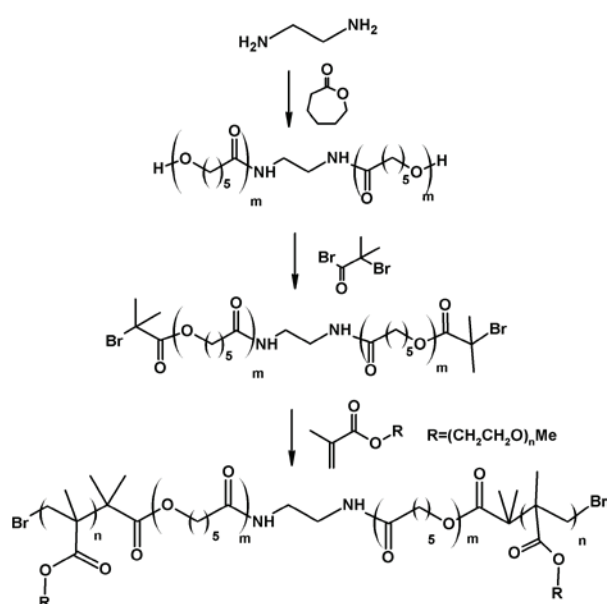


Schéma I-18 Synthèse de copolymères tribloc de type ABA PEGMA-*b*-PCL-*b*-PEGMA à partir d'un amorceur difonctionnel et d'un macroamorceur PCL α,ω fonctionnalisé

iv. Combinaison de méthodes

Wu *et al.* rapportent la synthèse de copolymères tribloc de type ABA combinant les différentes stratégies évoquées précédemment. Ils synthétisent premièrement un copolymère dibloc α -méthoxy-poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(acide lactique). L'extrémité de chaîne hydroxyle est ensuite modifiée en fonction alcyne. Le copolymère dibloc est finalement mis en présence d'un bloc α -méthoxy- ω -azido-poly(éthylène glycol) qui conduira à la formation d'un copolymère tribloc par la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre.⁸¹

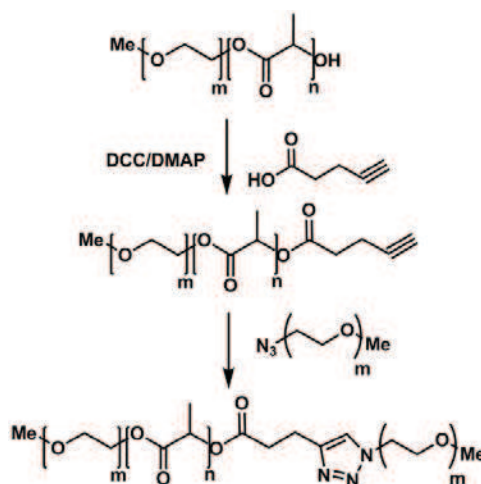


Schéma I-19 Synthèse d'un copolymère tribloc ABA PEG-*b*-PLA-*b*-PEG⁸¹

c. Copolymères multiblocs

Les copolymères multiblocs peuvent être obtenus selon deux stratégies principales. La première consiste à synthétiser des di ou tribloc et à les coupler entre eux de manière à obtenir un motif du type AB, BAB ou ABA se répétant n fois. La deuxième stratégie consiste à additionner de manière séquentielle les différents monomères qui devront avoir des réactivités similaires.

De nombreuses références concernent la première stratégie. Par exemple, Huh *et al.* rapportent la synthèse d'un copolymère amphiphile multiblocs (PEG-*b*-PLA-*b*-PEG) $_n$ de type (ABA) $_n$. Un bloc PLA est synthétisé, puis les extrémités de chaînes sont modifiées en fonction acide carboxylique pour être couplées à des blocs hydrophiles de PEG porteur de deux fonctions hydroxyle. Des liaisons esters sont formées entre les différents blocs.⁸² De manière similaire, pour obtenir un copolymère de type (BAB) $_n$, les bouts de chaînes d'un PEG diol peuvent également être modifiées pour obtenir un PEG diacide qui, une fois en présence d'un squelette de PCL diol se couplera grâce à une réaction d'estérification pour former le (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) $_n$.^{83,84}

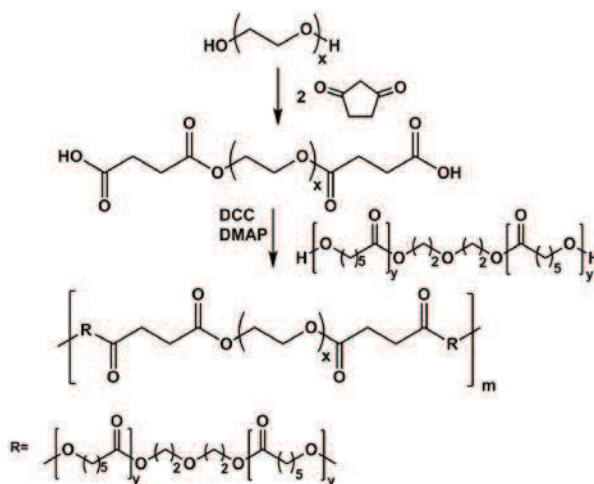


Schéma I-20 Illustration de la synthèse d'un multiblocs (ABA)_n^{83,84}

Les références concernant la synthèse de copolymères amphiphiles multiblocs à base de polyesters et de PEG par addition séquentielle de monomère sont cependant plus rares.

Tous ces systèmes de copolymères à blocs présentent l'avantage d'une synthèse relativement aisée avec des propriétés d'auto-assemblage qui seront discutées ultérieurement.

2. Copolymères greffés

Les copolymères greffés sont utilisés dans le but d'obtenir des architectures plus complexes, permettant d'accéder à un plus haut taux de fonctionnalisation le long du squelette, ce qui influe sur l'auto-assemblage du copolymère amphiphile ainsi formé et sur ses propriétés intrinsèques.

On parle de structures « classiques » lorsque le squelette est hydrophile (rouge) et les branches hydrophobes (noires). Ce genre de structure est généralement obtenu à partir d'un polysaccharide ou oligosaccharide sur lequel sont greffés des polymères tels que les polyesters de type PLA et PCL. (Figure I-4).⁸⁵⁻⁸⁹ L'association de polysaccharides biocompatibles et biodégradables à des polymères biodégradables permet de former des édifices avec des propriétés intéressantes pour des applications biomédicales et pharmaceutiques comme la délivrance de PA. Ces structures sont fréquentes dans la littérature car la grande quantité de groupements hydroxyle ou amine sur le squelette polysaccharide permet l'accès à un haut taux de fonctionnalisation et donc à une librairie de copolymères greffés assez vaste.⁹⁰

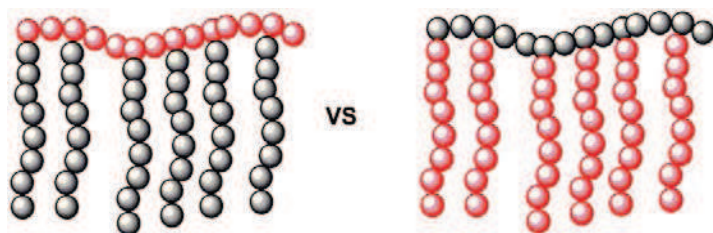


Figure I-4 structure classique (à gauche) vs structure inverse (à droite)

La deuxième catégorie, que l'on nomme communément structure « inverse », consiste en un squelette hydrophobe (noir) et des branches hydrophiles (rouge). Ce genre d'architecture est plus difficile à obtenir, en particulier lorsque le squelette est un polyester, puisqu'il nécessitera la fonctionnalisation de la chaîne polyester.

Nous nous intéressons ici aux structures inverses qui seront développées dans le cadre de cette thèse. Ce type de copolymère greffé peut s'obtenir selon plusieurs stratégies. La première stratégie consiste à copolymériser un macromonomère, avec un autre monomère : c'est la méthode « grafting through » (Figure I-5A). Les deux stratégies suivantes partent toutes les deux d'un squelette polyester préalablement fonctionnalisé pour venir soit « greffer » des polymères déjà préformés par la méthode « grafting onto » (Figure I-5B), soit polymériser d'autres monomères par la méthode « grafting from » (Figure I-5C).⁹¹

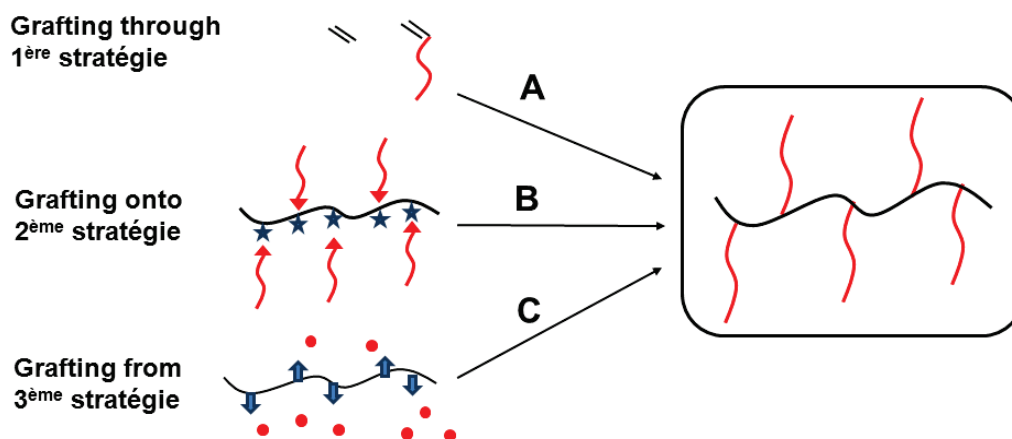


Figure I-5 Aperçu des différentes techniques (A) grafting through (B) grafting onto (C) grafting from

a. Stratégie 1 : « grafting through »

Pour cette stratégie, on utilise un macromonomère ou polymère fonctionnalisé en bout de chaîne par un groupement polymérisable. Il est nécessaire de déterminer tous les paramètres du

macromonomère avant de procéder à sa polymérisation. L'homopolymérisation ou la copolymérisation du macromonomère avec un autre monomère donnera l'accès à une large librairie de copolymères greffés.⁹²

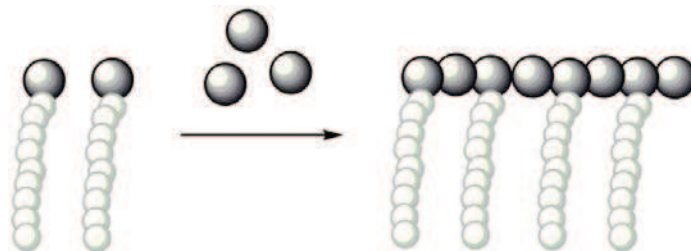


Figure I-6 Technique de « grafting through »

Il existe quelques exemples dans la littérature décrivant la synthèse de telles architectures passant par la synthèse de macromonomère comme celle rapportée par Rieger *et al.*⁹³ En effet, ils décrivent la synthèse d'un monomère ϵ -caprolactone modifié par un groupement PEG en position γ , et sa copolymérisation avec l' ϵ -caprolactone non modifiée, permettant de générer un squelette PCL avec des branches PEG.

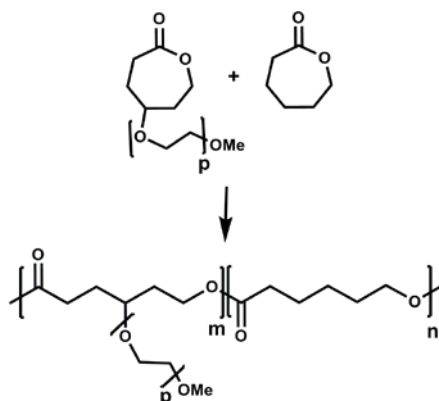


Schéma I-21 Synthèse de copolymère greffé PCL-g-PEG par la technique « grafting through »⁹³

Cette approche est toutefois limitée par plusieurs inconvénients. Tout d'abord, le faible rendement de la synthèse du macromonomère ϵ -caprolactone modifié, ensuite l'ouverture d'une lactone encombrée par un chaînon polymère n'est pas un processus aisé.⁹⁴ Enfin, il est difficile de déterminer la répartition des greffons, qui peut être statistique, à gradient ou à blocs.⁹⁵

D'autres équipes se sont intéressées à la synthèse de copolymères greffés en utilisant la même méthodologie de greffage mais en privilégiant le mode de polymérisation radicalaire contrôlée. En effet, Mespouille *et al.* décrivent par exemple la synthèse d'un macromonomère PCL, fonctionnalisé en bout de chaîne par l'acide méthacrylique et sa copolymérisation avec un monomère de la famille

des méthacrylates.^{96,97} Le contrôle de l'incorporation en co-monomère est effectué via le calcul initial des concentrations molaires en réactif.⁹⁸

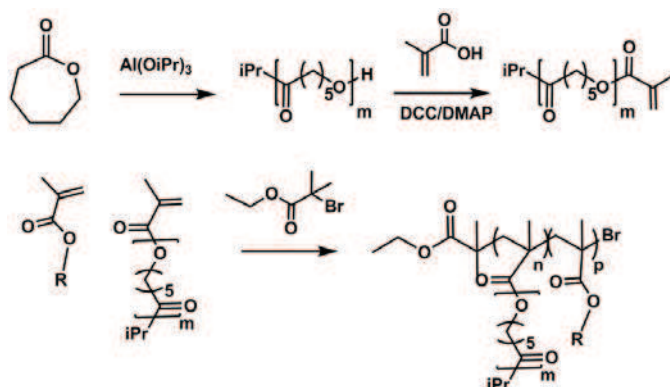


Schéma I-22 Synthèse de copolymères greffés par la copolymérisation d'un macromonomère PCL et d'un co-monomère méthacrylate^{96,97}

Cependant, ici, le poly(méthacrylate) constitue le squelette, et la PCL constitue les « greffons » ou branches du squelette. Il ne s'agit donc pas dans de structure greffée inverse. De plus, en supplément aux inconvénients listés précédemment, même si des copolymères amphiphiles avec des branches hydrophiles et/ou hydrophobes sont obtenus, le squelette de nature poly(méthacrylate) n'est pas biodégradable.⁹⁹

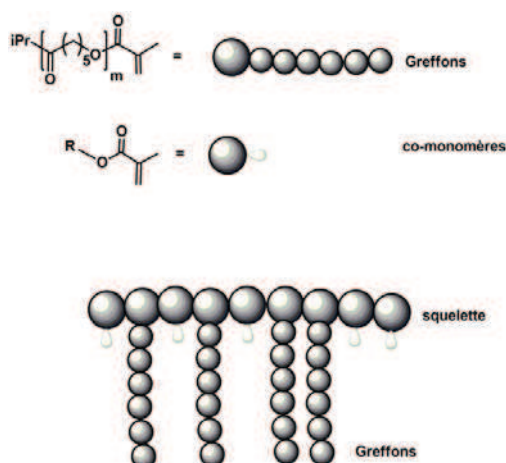


Figure I-7 Illustration de la composition du copolymère greffé par la méthode « grafting through »

L'objectif étant d'obtenir des copolymères greffés avec un squelette biodégradable, les techniques de greffage de type « grafting onto » et « grafting from » partant d'un squelette polyester fonctionnel paraissent plus intéressantes. Cependant, il est nécessaire au préalable de décrire comment ce squelette fonctionnel peut s'obtenir. Deux méthodes principales existent à ce jour. La

première partira de la synthèse de monomères fonctionnels (Figure I-8 A). La deuxième stratégie modifiera chimiquement un polymère préformé (Figure I-8 B).

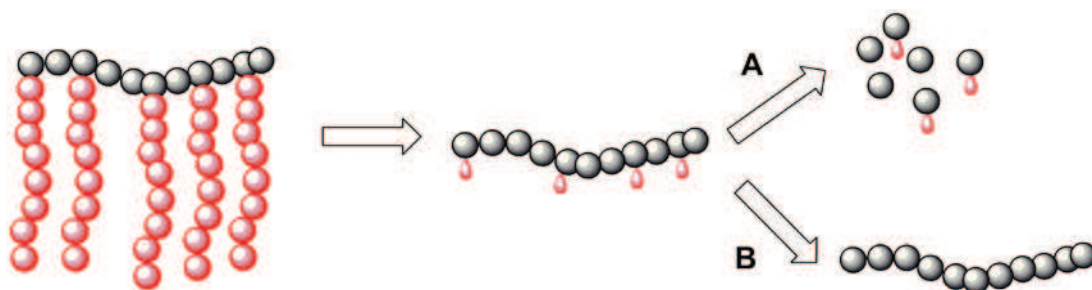


Figure I-8 Synthèse de squelette polyester fonctionnel à partir de deux méthodes

b. Synthèse d'un précurseur polymère fonctionnalisé

i. Synthèse de monomère fonctionnel et copolymérisation

Il existe dans la littérature de nombreux travaux relatifs à la synthèse de monomères fonctionnels, comme le relatent Tian *et al.*, permettant d'accéder à une large gamme de polymères fonctionnalisés après copolymérisation par ouverture de cycle avec d'autres monomères modifiés ou non (Schéma I-23).¹⁰⁰

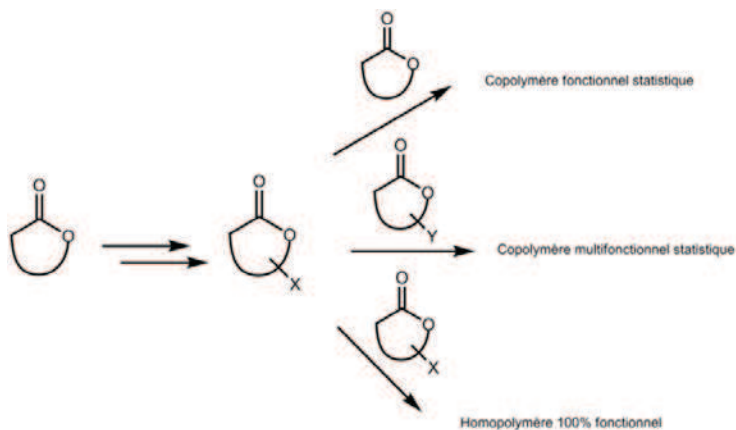


Schéma I-23 Homo ou copolymérisation du monomère fonctionnel

De nombreuses ϵ -caprolactones modifiées existent à ce jour car ce monomère présente l'avantage d'être assez facilement fonctionnalisable aux positions α et γ (Schéma I-24). Sa copolymérisation avec le monomère ϵ -caprolactone ou d'autres dilactones fonctionnelles permet l'obtention d'un squelette copolyester fonctionnel.

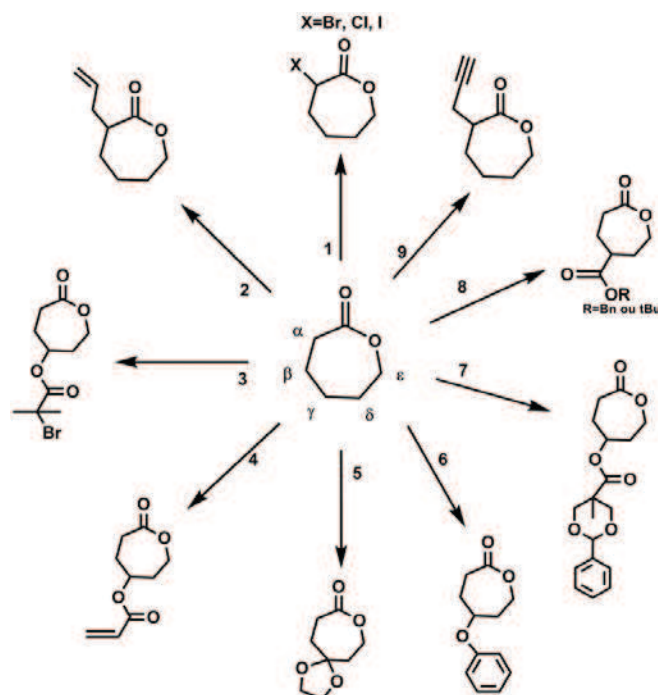


Schéma I-24 Monomères fonctionnalisés d'ε-caprolactone^{94,101-104,105-107}

Les différents monomères fonctionnels présentés dans le Schéma I-24 permettent d'obtenir, par copolymérisation des squelettes PCL porteurs de fonctions pendantes réactives. Certains squelettes présenteront ainsi des fonctions pendantes chlore, brome, azoture, allyle ou encore propargyle.^{94,101-}

¹⁰⁴ L'avantage des monomères utilisés dans les voies (1) à (4) et (9) est qu'ils peuvent être polymérisés sans l'utilisation de groupements protecteurs, fournissant directement un squelette fonctionnalisé. Les autres voies (5 à 8) fournissent également des copolyesters fonctionnels mais nécessitent des étapes de déprotection post-polymérisation pour obtenir des fonctions pendantes alcools, cétones et acides carboxyliques.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

La bibliothèque de monomères mono et/ou disubstitués des glycolides et lactides, donnant l'accès à un squelette polyester fonctionnalisé est beaucoup plus petite. Les différents monomères sont listés dans le Schéma I-25.

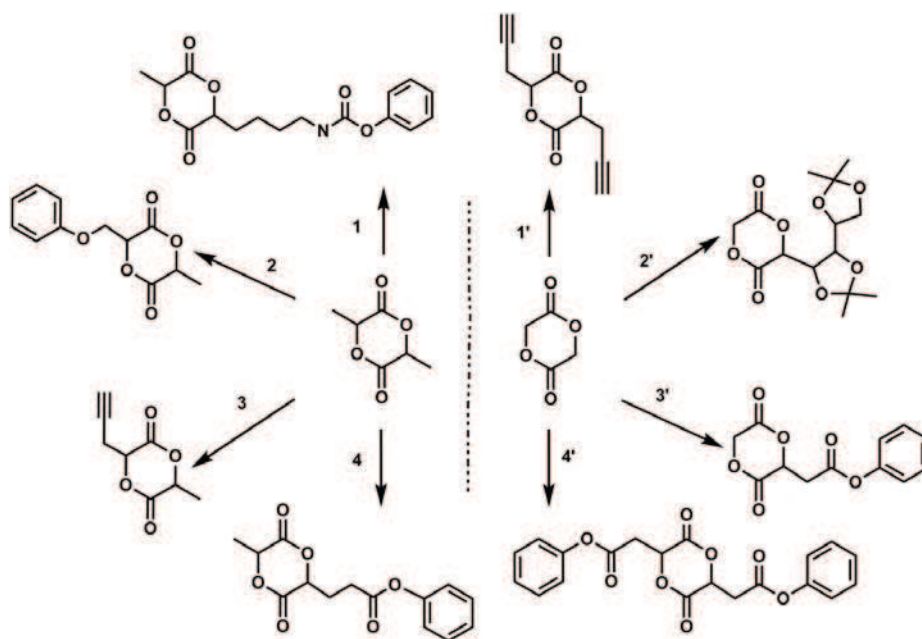


Schéma I-25 Monomères fonctionnalisés de lactide (gauche) et glycolide (droite) ^{38,108-110,111,112}

La copolymérisation de ces monomères fournit des squelettes polyester fonctionnels de deux types. Ceux nécessitant une étape de déprotection post-polymérisation, à partir des monomères (1), (2), (4) et (2') à (4'),^{38,108-110} et ceux permettant une réaction de greffage directe, comme les copolyesters issus de la copolymérisation des monomères (3) et/ou (1'). La stratégie de synthèse (3) permet de créer un lactide monopropargylé qui une fois copolymérisé fournit un squelette polyester porteur de fonctions alcyne pendants.¹¹¹ De manière similaire, mais à partir du glycolide, Jiang *et al.* ont mis en évidence la synthèse d'un glycolide dipropargylé. Le monomère a été copolymérisé pour obtenir un squelette polyester également porteur de fonctions alcynes pendants mais avec différentes propriétés notamment la biodégradation.¹¹²

Les principaux inconvénients de cette stratégie de synthèse restent le coût et le rendement souvent faible. De plus, les monomères porteurs de fonctions susceptibles de réagir avec les catalyseurs de polymérisation doivent être protégés avant la polymérisation. Les éthers de benzyle peuvent être utilisés et déprotégés après polymérisation. Il faut également noter que la nature du groupe protecteur a son importance, puisque le processus de déprotection doit s'effectuer sans dégrader le polymère fraîchement synthétisé.¹¹³

En revanche, cette approche permet un bon contrôle du taux de fonctionnalisation et donc d'incorporation du monomère fonctionnalisé.¹¹⁴ De même, le fait de synthétiser le monomère apportant un groupement fonctionnel avant de procéder à la polymérisation permet d'avoir des

monomères déjà purifiés évitant ainsi la contamination du milieu, et donc une éventuelle dégradation du polymère formé.

ii. *Modification chimique de squelette polymère préformé*

La deuxième approche, comme évoquée précédemment, consiste à modifier chimiquement un polymère préformé (Schéma I-26).¹¹⁵⁻¹¹⁷

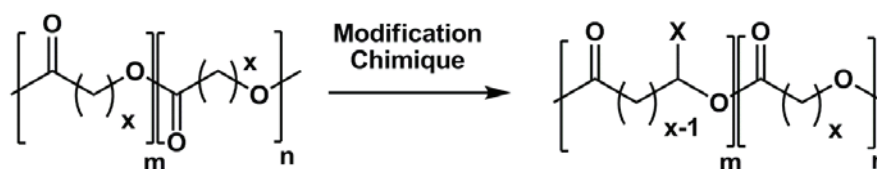


Schéma I-26 Modification chimique d'un polymère préformé¹¹⁵⁻¹¹⁷

De nombreux articles relatent la modification de squelettes polyester tels que la PCL par voie anionique. En effet, l'utilisation d'une base forte, comme le lithium diisopropylacrylamide (LDA), génère un carbanion sur le squelette de la PCL en α des fonctions carbonyles. Cette approche entraîne des coupures et une certaine dégradation du polymère. Les polymères types PGA et PLA résistant beaucoup moins à une telle base forte, cette stratégie se limite bien souvent à l'utilisation de la PCL.¹¹⁷

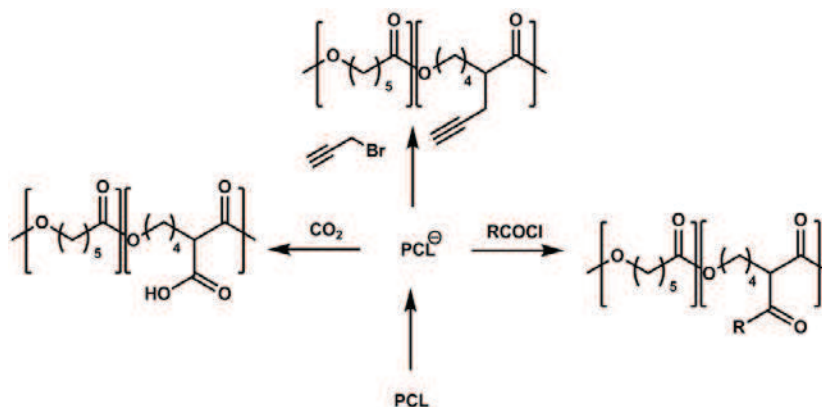


Schéma I-27 Modification de la PCL^{117,118,119}

À partir d'une PCL activée par voie anionique, il est possible d'effectuer de multiples réactions permettant d'obtenir des squelettes PCL fonctionnalisés. Par exemple, avec des groupements acides carboxyliques ou des groupements propargyliques.^{118,119} À partir de ces macropolycarbanions, des blocs préformés de polymères peuvent être couplés (stratégie « grafting onto »), et certains monomères peuvent également être polymérisés (stratégie « grafting from »).

D'autres équipes se sont intéressées à la modification de la PCL par un processus physique comme l'extrusion réactive. Ils ont ainsi obtenu des squelettes PCL fonctionnalisés par des groupements oxazoline et anhydride.¹²⁰⁻¹²²

Afin de pouvoir fonctionnaliser d'autres types de polyesters, comme le PLA, d'autres stratégies que l'activation anionique, moins agressives, ont également été mises en place.^{115,116,123}

On pourra noter également que ces squelettes polyester fonctionnalisés, pourront ensuite être modifiés chimiquement une nouvelle fois, dans le but d'obtenir davantage de fonctionnalisation ou d'autres groupements fonctionnels plus réactifs et adaptés pour la stratégie chimique utilisée. Ainsi, un squelette poly(ϵ -caprolactone) porteur de fonctions pendantes chlorées pourra être modifié en visant l'obtention d'un squelette porteur de fonctions pendantes azotures.^{26,124}

À partir de ces squelettes fonctionnels, des architectures greffées pourront être créées. Les deux techniques de greffages restantes, « grafting onto » et « grafting from », seront maintenant décrites.

c. Stratégie 2 : « Grafting onto »

Ce type de greffage consiste à lier de manière covalente sur les fonctions pendantes du squelette polyester existant un polymère préformé et fonctionnalisé en bout de chaînes. Ce type de technique n'implique pas de réaction en chaîne, mais une seule et unique étape de ligation.

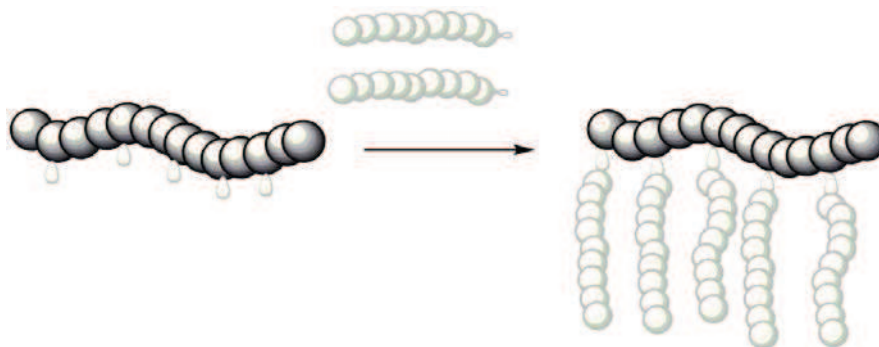


Figure I-9 technique « grafting to » ou « grafting onto »

Ainsi, à partir des squelettes polyester fonctionnalisés décrits précédemment, une multitude de réactions de couplage avec d'autres polymères sont possibles. Par exemple, le macropolycarbanion de PCL présenté précédemment peut réagir avec un bloc de PEG activé en bout de chaîne par un groupement bromoacétyle pour former un copolymère greffé amphiphile avec des branches de PEG.^{125,126}

Pan *et al.* ont également établi qu'à partir d'un squelette polyester porteur de fonctions hydroxyle, il était possible de greffer des branches de PEG porteuses de fonctions acide carboxylique activées en bout de chaîne. De même, les squelettes PLA fonctionnalisés avec un groupement maléimide peuvent être couplés à des polymères tels que le PEG fonctionnalisé en bout de chaînes par des groupements amines.^{127,128}

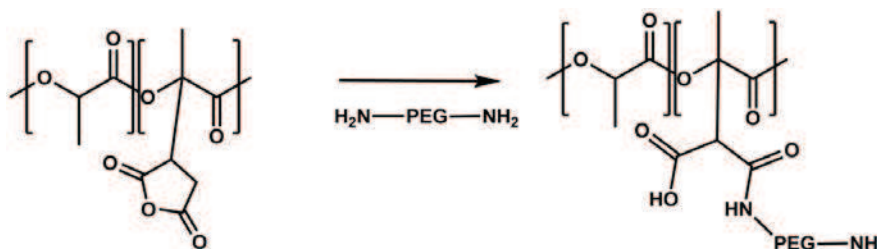


Schéma I-28 Copolymère greffé PLA-g-PEG.^{127,128}

Une stratégie largement employée depuis les travaux de Rostovtsev *et al.*¹²⁹ pour établir la liaison entre les « branches » et le squelette est la chimie « clic ».

En effet, la chimie « clic », et plus particulièrement la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (ou CuAAC) a été adaptée aux systèmes polymères. Cette réaction permet un couplage quasi quantitatif entre une fonction azoture et une fonction alcyne pour former un cycle triazole, de manière régiosélective.^{130,131}

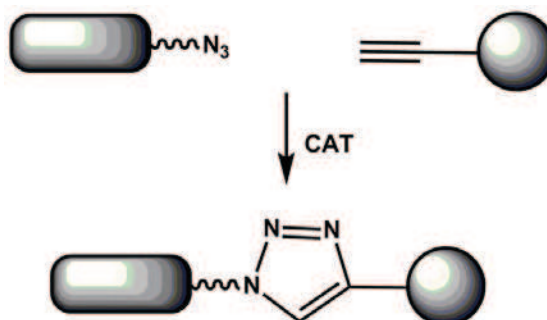


Schéma I-29 Représentation de la chimie « clic »

La première synthèse de copolymères greffés à être rapportée est celle d'un squelette PCL greffé avec du PEG par cycloaddition de Huisgen.^{132,133}

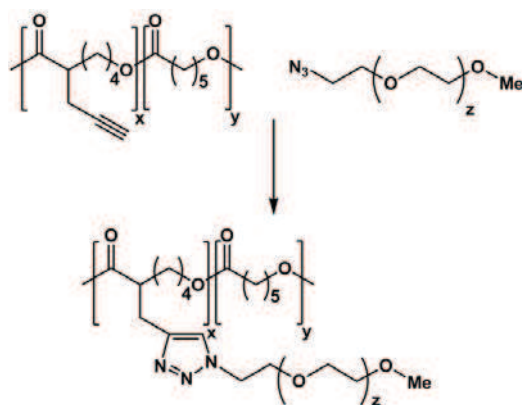


Schéma I-30 Synthèse de copolymères greffés PCL-*g*-PEG par chimie « clic »^{132,133}

Depuis, de nombreux polymères ont été fonctionnalisés de manière à utiliser cette approche. Ainsi, des squelettes fonctionnalisés par des fonctions alcyne ou azoture pendants pour créer des copolymères amphiphiles greffés avec des groupements hydrophiles variés (Schéma I-31).^{134–137}

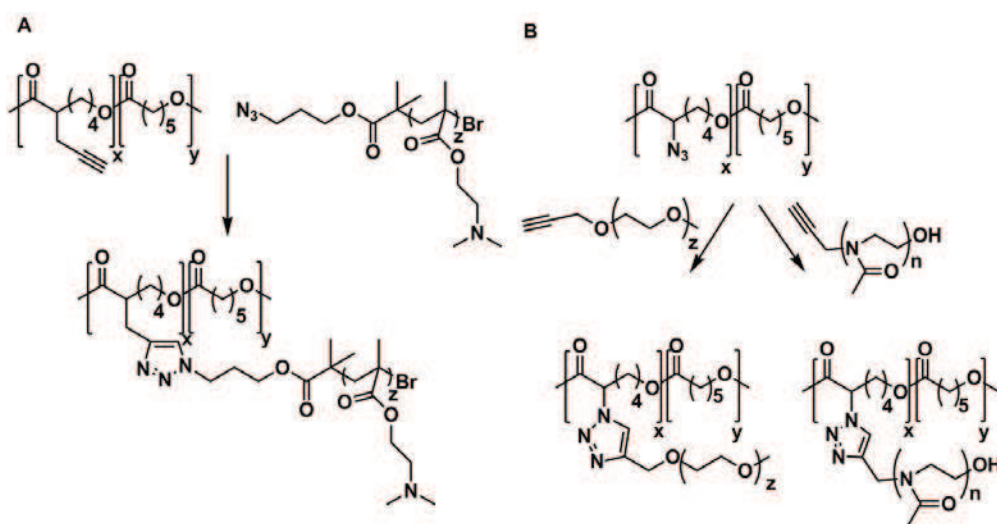


Schéma I-31 Copolymères greffés par CuAAC (A) PCL-*g*-PDMAEMA (B) PCL-*g*-PEG et PCL-*g*-POx^{134–137}

Dans chacune de ces synthèses, l'avantage principal reste la possibilité de caractériser chacun des polymères préformés avant la réaction de couplage. L'étude du copolymère fonctionnalisé permettra par exemple de déterminer le pourcentage de fonctionnalisation ou le nombre de sites accessibles pour la réaction. Ceci permet d'ajuster les quantités de réactifs à introduire pour une meilleure efficacité de la réaction. L'étude du copolymère greffé, par rapport aux données des polymères avant greffage, permettra de déterminer un taux de greffage, donc un taux d'«efficacité» du couplage. Cette technique est cependant limitée par plusieurs paramètres : l'incompatibilité de certains polymères que l'on voudrait greffer ensemble et l'accessibilité des fonctions présentes sur le squelette.⁹⁵

d. Stratégie 3 : « Grafting from »

L'intérêt de cette dernière méthodologie de greffage est d'utiliser la génération de sites actifs le long de la chaîne polyester capables d'amorcer la polymérisation de monomères qui constitueront les futures branches du polymère. Ici aussi, le nombre de branches pourra être estimé à partir de l'étude du polyester fonctionnalisé.

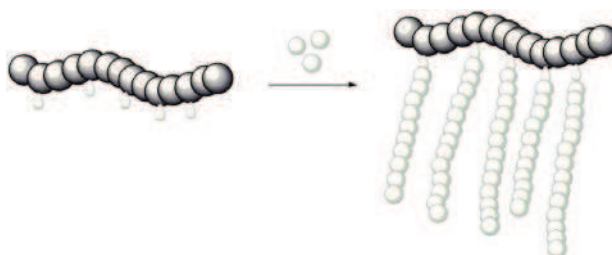


Figure I-10 Méthode "grafting from"

Ce type d'approche nécessite la présence le long du squelette polyester, de fonctions adaptées pour amorcer la polymérisation d'autres monomères. Le squelette sert alors de macroamorceur. Quelques exemples illustrant cette approche sont trouvés dans la littérature. Ainsi le copolymère PCL portant des fonctions bromées décrit précédemment par Mecerreyes *et al.* permet la polymérisation de monomères de type méthacrylates.⁹⁴

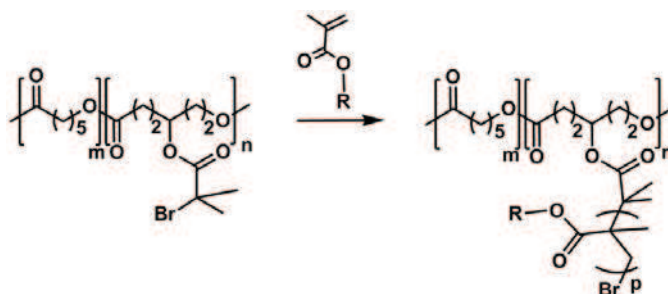


Schéma I-32 Copolymère greffé de type poly(ε-caprolactone)-graft-polyméthacrylate⁹⁴

Dans un même registre Tian et Trollsas rapportent la possibilité de polymériser par ouverture de cycle d'autres monomères comme l'oxyde d'éthylène à partir d'une PCL hydroxylée.^{94,100,101,105-107}

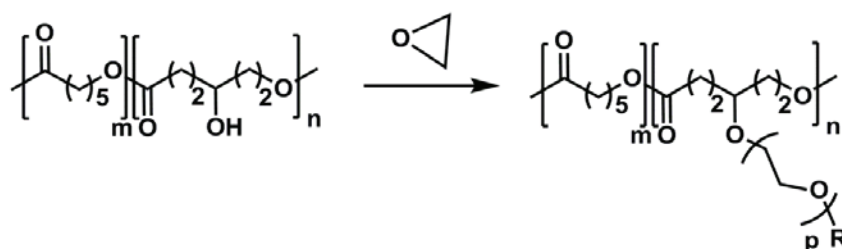


Schéma I-33 Copolymère greffé de type poly(ε-caprolactone)-graft-poly(éthylène glycol)

Il existe cependant à ce jour peu de données dans la littérature concernant cette approche avec des polyesters fonctionnalisés comme squelette sans oublier que cette stratégie de synthèse comporte l'inconvénient de ne pas pouvoir contrôler et déterminer les masses molaires des branches synthétisées, à moins de cliver les greffons du squelette.⁹⁵

Au final, les différentes techniques de greffage présentent des avantages et des inconvénients. Il apparaît cependant clairement que la première stratégie (« grafting through ») est plus difficilement applicable aux systèmes à base de polyesters aliphatiques. La deuxième stratégie (« grafting onto ») présente l'avantage de contrôler la longueur des greffons et de caractériser totalement la structure même si la substitution est plus difficile à cause de l'encombrement stérique. La dernière stratégie (« grafting from ») affiche un taux de substitution plus élevé car moins d'encombrement stérique est observé. Cependant, la longueur des greffons n'est pas déterminée et plus difficilement contrôlée.

En parallèle aux copolymères greffés, les copolymères multiblocs non linéaires permettent de créer de nouvelles architectures également capables de s'auto-assembler.

3. Copolymères multiblocs non linéaires

Les copolymères multiblocs non linéaires ont connu un essor dans les années 2000, notamment les systèmes à base de PEG, car ce sont des systèmes faciles à synthétiser et qui donnent de bons résultats pour les applications médicales, sachant que l'on pourra contrôler le comportement en milieu biologique à partir de la structure.^{138,139}

Dans ce genre de copolymères, des molécules multifonctionnelles peuvent être utilisées pour amorcer les polymérisations, on parlera de polymères en étoile ou « star-shaped ».¹⁴⁰ Au sein même de cette catégorie, d'autres sous-catégories existent en fonction de leur architecture et de leur composition comme les copolymères « miktoarm ».

a. Copolymères en étoile

Si l'on se fie à la définition de Hadjichristidis *et al.*,¹⁴¹ les copolymères en étoile sont constitués d'un « cœur » dont partent des bras. Ce genre de copolymère présente un intérêt particulier car la molécule totale synthétisée possède une certaine symétrie et un certain degré d'ordre intramoléculaire.¹⁴²

Selon Lapienis,¹⁴³ deux stratégies de synthèse existent. La stratégie « core first » s'apparente à la technique « grafting from » et utilise les fonctions présentes sur la molécule constituant le cœur pour amorcer la polymérisation de monomères (Figure I-11). La stratégie « arm first » s'apparente à la technique « grafting onto » et utilise les fonctions présentes sur la molécule centrale pour venir coupler les « bras » de polymères préformés. De nombreux travaux ont porté sur la synthèse de ce type de copolymères à base de polyester et de PEG.^{144,145,146}

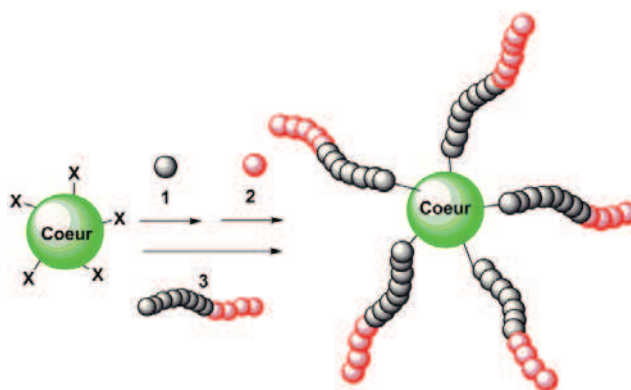


Figure I-11 Copolymère en étoile par les méthodes « core first » (1 et 2) et « arm first » (3)

Nabid *et al.* rapportent par exemple la synthèse d'un cœur hydrophobe de PCL, dont les extrémités de chaîne sont modifiées pour coupler des segments hydrophiles de PEG, et obtenir une structure en étoile de type A_4B_8 (Schéma I-34).¹⁴⁷

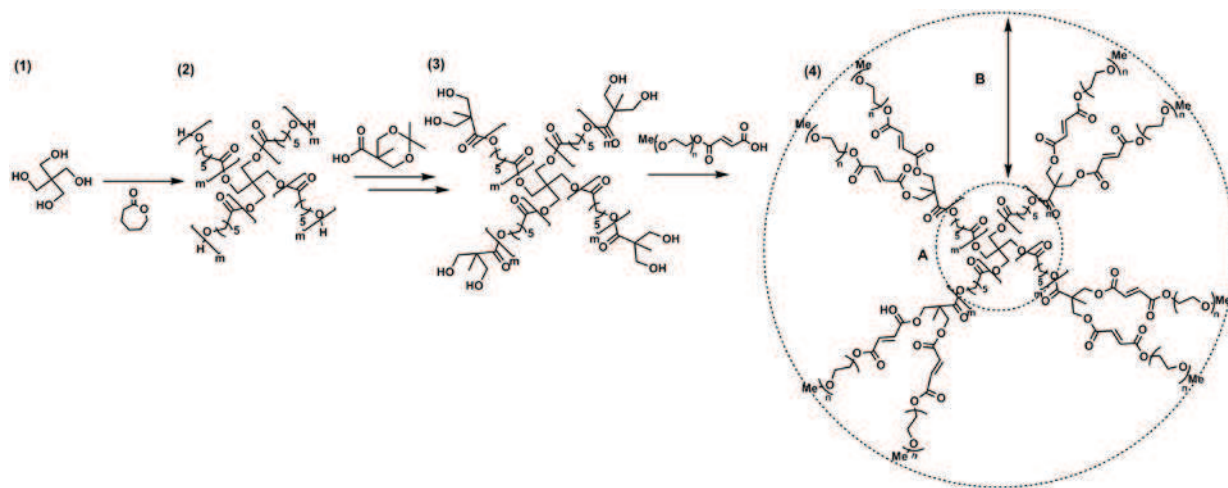


Schéma I-34 Synthèse d'un copolymère en étoile

(1) amorceur multifonctionnel ; (2) cœur poly(ϵ -caprolactone) à 4 branches ; (3) cœur avec extrémités de chaîne modifiées

(4) copolymère en étoile (A_4B_8) avec A : cœur poly(ϵ -caprolactone) hydrophobe ; B : chaînons hydrophiles poly(éthylène glycol)

Ces copolymères en étoile de structure (A_nB_n) sont les plus simples. D'autres architectures peuvent être obtenues en modifiant les voies de synthèse ou la nature du bras. De même, en fonction de la nature des groupements présents sur la molécule constituant le cœur, on pourra former des copolymères « miktoarm ».

b. Les copolymères « miktoarm »

Les copolymères « miktoarm », du grec mikto voulant dire mélangé, sont une classe à part de copolymères non linéaires où des polymères de nature différentes seront liés à un même centre. Un copolymère de cette classe pourra donc être amphiphile sans que les blocs hydrophobes et hydrophiles soient liés directement l'un à l'autre (Figure I-12).

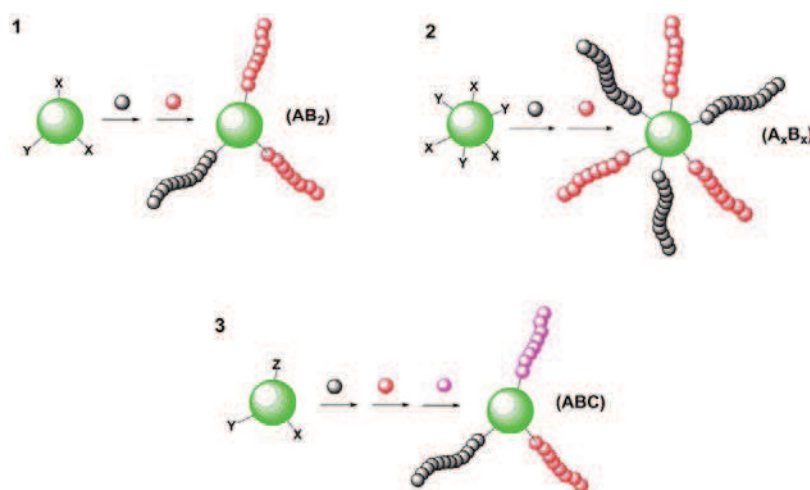


Figure I-12 Architectures « miktoarm » par la méthode « core first »

Les copolymères amphiphiles miktoarm de type ABC ou AB_2 ne manquent pas dans la littérature et sont relativement faciles à synthétiser.^{148,149,150,151} Beaucoup de polymères de la famille des méthacrylates ayant des propriétés thermosensibles ou pH sensibles sont utilisés et polymérisés par voie radicalaire pour conférer davantage de propriétés physico-chimiques à ces nouvelles structures.

Qian *et al.* rapportent la synthèse de copolymères amphiphiles en étoile de composition variées (AB_3 , $(AB_3)_2$, $(AB_3)_3$) combinant toutes les stratégies de synthèse évoquées précédemment (Schéma I-35). A représente les blocs de PLA et B les blocs de poly(méthacrylate de diméthyle aminoéthyle) (PDMAEMA).¹⁵²

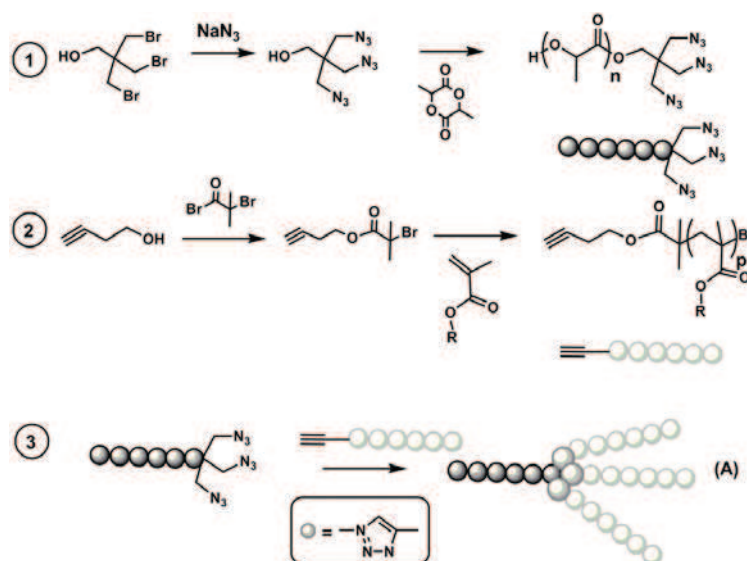


Schéma I-35 Synthèse de copolymères en étoile de type « miktoarm » AB_3

(1) Synthèse du bloc poly(acide lactique) porteur de trois fonctions azotures ; (2) synthèse du bloc polyméthacrylate fonctionnalisé par une fonction alcyne ; (3) couplage entre les fonctions azotures et alcynes par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre

La structure formée par l'assemblage de deux de ces copolymères de type AB_3 est d'ailleurs répertoriée par Gorrasi *et al.* comme un polymère de type « pompom ». ¹⁵³ Le couplage suivant fera référence à un copolymère de type étoile possédant un cœur et des branches (AB_3)₃.

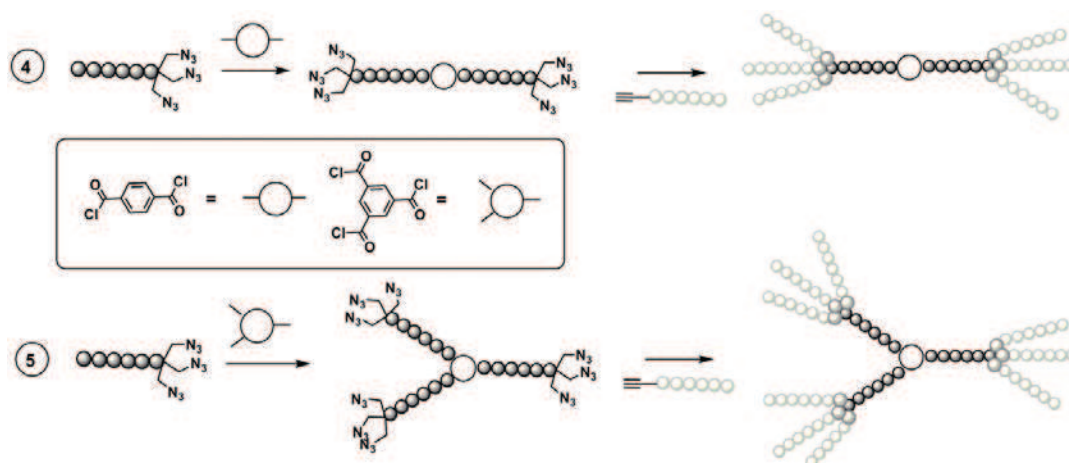


Schéma I-36 Copolymères « miktoarm » de type $(AB_3)_n$

(4) Couplage entre deux blocs de PLA et le chlorure de téréphthaloyle fournissant une architecture "pompom" $(AB_3)_2$;
(5) Couplage entre trois blocs de PLA et le chlorure de trimésyle fournissant une architecture étoile $(AB_3)_3$

Au final, grâce à de nombreuses stratégies de synthèse, une large bibliothèque de copolymères amphiphiles de composition et d'architectures variées est disponible. Il nous reste maintenant à

déterminer les propriétés physico-chimiques en milieu aqueux de tels copolymères et étudier comment leurs propriétés influent sur leur capacité à encapsuler des principes actifs.

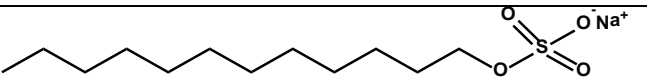
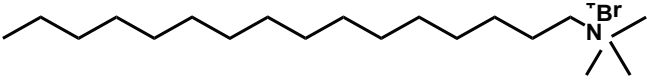
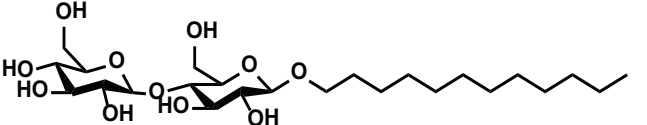
C. Auto-assemblage en milieu aqueux

Les auto-assemblages sont des entités supramoléculaires résultant de l'union spontanée et réversible de molécules, grâce à des interactions non covalentes.¹⁵⁴ Ces interactions pourront être de type π - π , hydrophobes, électrostatiques, Van Der Waals, ou des liaisons hydrogène. Dans cette partie, les auto-assemblages et leurs propriétés seront tout d'abord définis, puis les différents auto-assemblages et leurs méthodes de formation ou formulation seront étudiés.^{155–157} Enfin, les facteurs structuraux, inhérents à la structure du copolymère amphiphile, pouvant influencer la nature de l'auto-assemblage, seront également passés en revue.^{158,159}

1. Définitions

Les premières molécules amphiphiles à avoir démontré des capacités d'auto-association sont les tensioactifs (ou surfactants). Ces molécules peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Elles sont constituées d'une part d'une tête hydrophile ou polaire et d'autre part d'une queue hydrophobe ou apolaire. Elles possèdent de ce fait la faculté de s'auto-organiser en milieu aqueux de manière à former une structure de type coeur-couronne avec les parties hydrophiles à l'extérieur, et les parties hydrophobes au coeur du complexe.¹⁶⁰ Ces objets ont été décrits et caractérisés dès 1908.¹⁶¹ Les tensioactifs peuvent être des petites molécules (Tableau I-5)

Tableau I-5 Molécules tensioactives ou surfactantes

Tensioactif	Formule	CMC (mmol.L ⁻¹)
Dodécylsulfate de sodium		10
Bromure de cétrimonium		1
n-dodécyl- β -D-maltoside		0,1

Avec leurs deux parties hydrophile et hydrophobe, les copolymères amphiphiles se comportent comme des tensioactifs. Dans l'eau, ces copolymères s'auto-assemblent pour former des petits agrégats micellaires de manière à ce que la partie hydrophobe soit dirigée vers l'intérieur et la partie hydrophile vers l'extérieur. Leur auto-association permet de former une grande variété d'édifices de

morphologies différentes (plus de 30) avec des propriétés ajustables et des tailles allant de l'échelle nanométrique au micron.¹⁶²

L'association de ces copolymères est caractérisée par de nombreux facteurs. Premièrement, le phénomène d'association dépend de l'équilibre dynamique entre les unimères (copolymère isolé) et les agrégats micellaires formés. Cet équilibre de formation des agrégats micellaires est atteint lorsque pour une température donnée la concentration micellaire critique (CMC) ou concentration d'agrégation critique (CAC) est atteinte. L'avantage relatif à l'utilisation de copolymères amphiphiles pour préparer des auto-assemblages est qu'ils possèdent des concentrations micellaires critiques nettement inférieures (10^{-5} - 10^{-8} mol.L⁻¹) à celles des tensioactifs comme le dodécylsulfate de sodium (Tableau I-5). Il existe également une température minimale, appelée température de Kraft, en dessous de laquelle les tensioactifs se trouveront sous forme cristalline et donc dans l'incapacité de s'auto-assembler.¹⁶³ Selon Hamley,¹⁶⁴ le paramètre d'empilement p , défini comme le rapport de l'aire de la queue hydrophobe sur l'aire de la tête hydrophile, permet de déterminer quel type d'auto-assemblage peuvent être formés : nano-objets sphériques type micelle, vésicules ou nanotubes (Figure I-13).¹⁶⁵

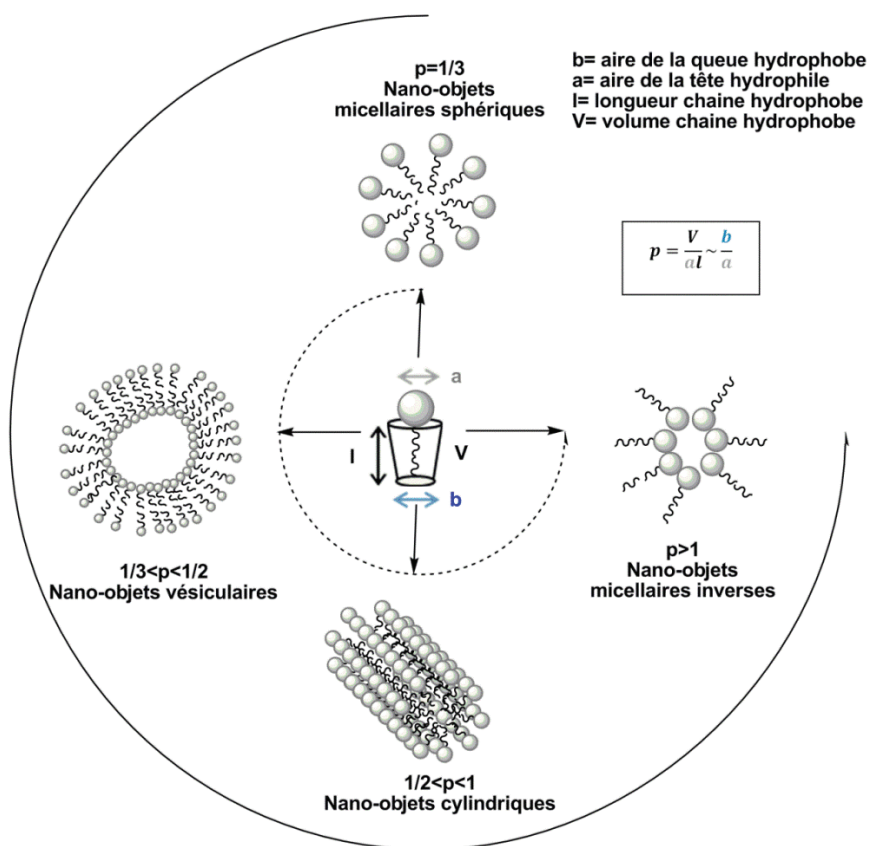


Figure I-13 Schéma d'un tensioactif, comparable à un copolymère à bloc et auto-assemblage

Ce paramètre d'empilement est associé à la balance hydrophile / hydrophobe (HLB). Un modèle empirique proposé par Griffin permet de prédire le comportement associatif des copolymères amphiphiles non ioniques en milieu aqueux en fonction de la masse molaire des segments hydrophile et hydrophobe. Griffin définit donc l'HLB selon l'équation 1.1 comme le ratio de la masse molaire du segment hydrophile sur la masse molaire totale du copolymère amphiphile. La valeur obtenue, sur une échelle de 0 à 20, indique la solubilité globale du complexe, l'affinité vis-à-vis de certains solvants et la nature des objets que le copolymère pourra former en milieu aqueux (latex, micelles, gels...).^{166,167}

$$HLB = \frac{\text{masse molaire (hydrophile)}}{\text{masse molaire (totale)}} \times 20 \quad \text{Eq. 1.1}$$

Cette HLB servira de référence pour chaque copolymère synthétisé afin d'estimer leur comportement.

On notera que pour deux copolymères ayant la même valeur HLB, si l'architecture est différente, les propriétés physico-chimiques seront différentes, ce qui entraînera un comportement différent en milieu aqueux.

Ainsi, le calcul de l'HLB (comme introduit précédemment), la détermination de la concentration micellaire critique (ou CAC) et le calcul du paramètre d'empilement p donneront une indication sur la morphologie et la stabilité de tels auto-assemblages.

2. Formulation & Classification

La catégorie des auto-assemblages formés par les copolymères amphiphiles à base de polyester qui nous intéresse est celle des nanoparticules. Selon Vert *et al.*, une nanoparticule sera définie comme une particule dont les dimensions sont comprises entre 1×10^{-7} et 1×10^{-9} m.²

Les systèmes de nanoparticules polymères (NP) sont constitués des nanocapsules, des nanosphères, des polymersomes (vésicule à base de polymères), des micelles et des agrégats de type micelles. On peut également inclure dans ce descriptif la sous-catégorie dénommée nanogels car bien que celle-ci possède des propriétés différentes des nanoparticules listées précédemment, elle s'obtient à partir d'une réticulation chimique ou physique d'un ou plusieurs composants de ces nanoparticules.¹⁶⁸

La Figure I-14 résume les différentes catégories de nanoparticules.

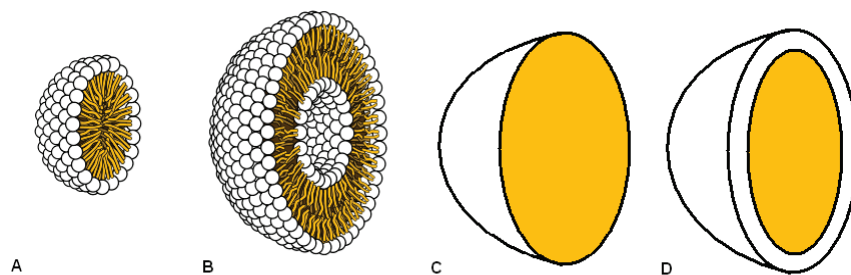


Figure I-14 (A) Micelle ; (B) Polymersomes ; (C) Nanosphères ; (D) Nanocapsules

La coloration blanche représente la partie hydrophile tandis que la coloration jaune représente la partie hydrophobe

a. Micelles et agrégats de type micelles

Les micelles résultent d'un processus de minimisation des contacts entre les molécules d'eau et les blocs hydrophobes. Etant donné la structure, le copolymère s'auto-assemblera de manière à présenter ses parties hydrophiles à l'extérieur et regrouper ses parties hydrophobes à l'intérieur.

La Figure I-15 présente l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles d'architectures différentes sous forme de micelles en milieu aqueux.

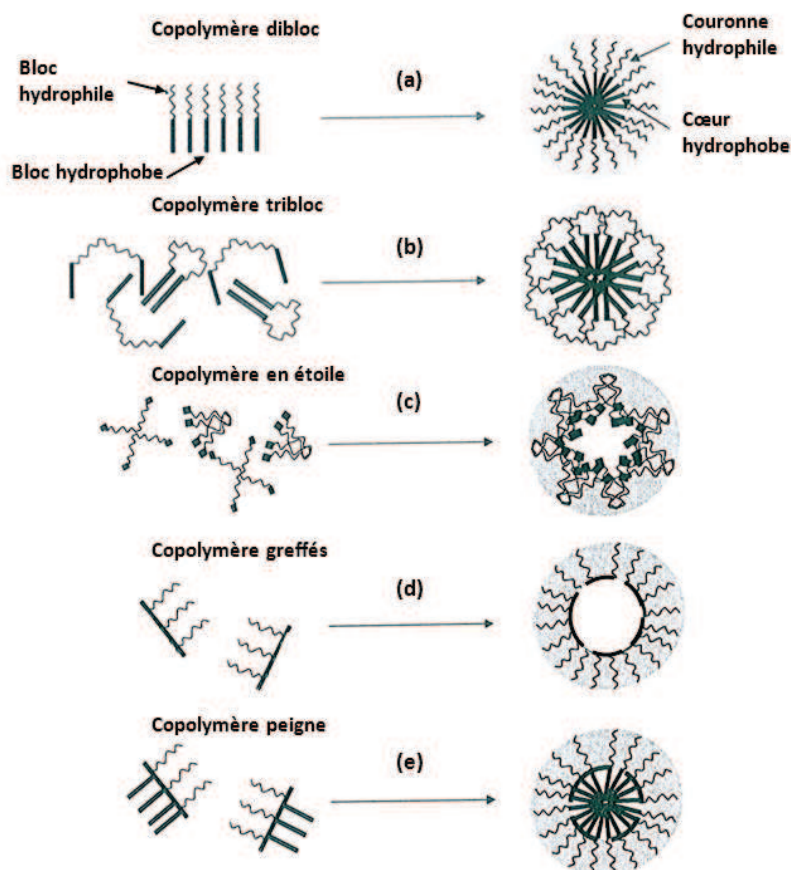


Figure I-15 Auto-assemblage de copolymères dibloc, tribloc et greffé sous forme de micelles¹⁶⁹

Ce type d'objets peut être obtenu par plusieurs méthodes.

- La dissolution directe consiste à disperser le copolymère amphiphile directement dans une solution aqueuse.

Les méthodes suivantes commencent toutes avec la dispersion du copolymère dans un solvant organique. Ensuite, plusieurs méthodologies peuvent être utilisées.^{8,157,170,171}

- La dialyse consiste à introduire directement dans un boyau de dialyse contre de l'eau la solution organique permettant que l'eau remplace progressivement le solvant. La solution contenue dans le boyau de dialyse sera récupérée ainsi que les micelles formées.
- La nano-précipitation consiste à ajouter, goutte-à-goutte, la solution organique contenant le copolymère à une solution aqueuse. Ensuite, la solution est introduite dans un boyau de dialyse contre de l'eau, où le mélange solvant/eau sera remplacé par de l'eau.
- Le « film-casting » consiste à évaporer le solvant de la solution organique de manière à former un film. Une solution aqueuse sera ensuite ajoutée.

Les micelles et les agrégats de types micelle seront caractérisés à la manière des tensioactifs, par leur structure cœur-couronne. Dans le cas de formation de micelles bien définies, l'évaluation du paramètre d'empilement p permettra également de déterminer la morphologie des objets obtenus, à savoir sphérique, tubulaire ou vésiculaire. Les systèmes vésiculaires constituent la sous-catégorie suivante : les polymersomes.

b. Polymersomes

Les polymersomes sont des vésicules polymères construites à partir de l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles en milieu aqueux et présentant une structure compartimentée analogue aux liposomes (Figure I-16).

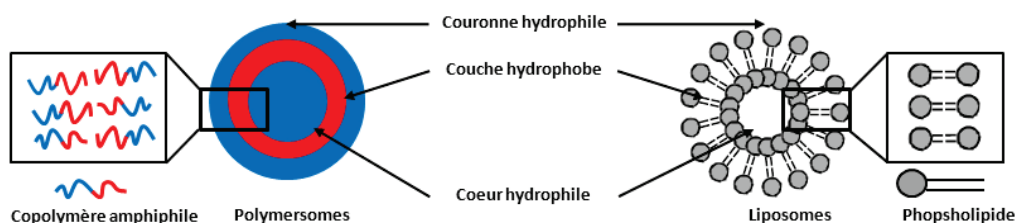


Figure I-16 Composition d'une vésicule constituée de copolymère amphiphile ou de phospholipide

Les liposomes sont généralement constitués d'une bicouche lipidique à base de phospholipides ce qui permet de mimer les propriétés d'une membrane cellulaire. Cependant, les liposomes se révèlent instables et difficiles à manipuler ou fonctionnaliser. Les polymersomes apparaissent comme les concurrents synthétiques des liposomes puisqu'ils présentent une stabilité plus importante et une possibilité accrue de fonctionnalisation de surface.¹⁷²⁻¹⁷⁵ Leur « bifonctionnalité » est mise en évidence par leur structuration : ils possèdent un large « cœur » hydrophile, une couche/membrane hydrophobe terminée par une couronne hydrophile.^{176,177} Les polymersomes peuvent être préparés selon plusieurs méthodes, formant des objets dont le diamètre varie entre 100 nm et 10 μm .¹⁵⁴

- La méthode de la double émulsion est illustrée sur la Figure I-17.¹⁷⁸ Le copolymère amphiphile dispersé dans le solvant volatile s'auto-assemble en monocouche à l'interface entre le solvant et l'eau. L'évaporation du solvant conduit à la formation de la bicouche polymère, et donc au polymersome.^{179,180}

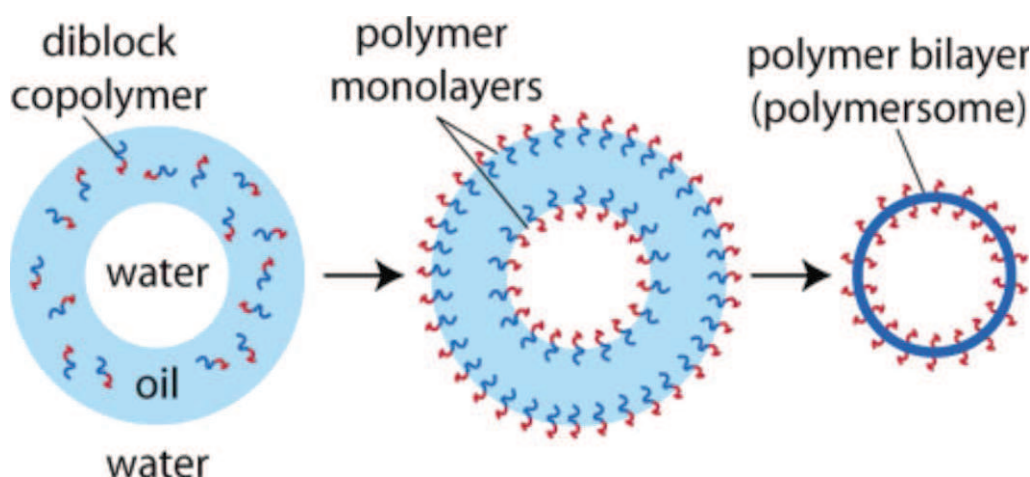


Figure I-17 Procédé de la double émulsion¹⁷⁹

- La nano-précipitation, dont le concept a été décrit précédemment.^{181,182}
- La réhydratation de film consiste à dissoudre le copolymère amphiphile dans un minimum de solvant volatile. Ensuite, le solvant est évaporé et l'eau ultra-pure est ajoutée. La solution est laissée sous agitation pendant plusieurs jours à température ambiante, puis plusieurs semaines à 40-50°C pour assurer la dispersion maximale des polymersomes.

Zhang *et al.* illustrent la formation de polymersomes à partir d'un copolymère amphiphile tribloc de type ABA composé de PCL et de PEG par la méthode de réhydratation de film. Ce copolymère forme un polymersome avec un cœur et une couronne de PEG hydrophiles et une couche intermédiaire de PCL hydrophobe.¹⁸³

c. Nanosphères et nanocapsules polymères

Les nanocapsules et les nanosphères sont par définition composées de polymères avec la capacité de s'assembler en milieu aqueux. La différence entre ces deux types de nanoparticules réside dans leur composition (Figure I-18). Les nanosphères sont des nanoparticules de forme sphérique, sans aucune couche distincte, composée d'une matrice dans laquelle des substances peuvent être encapsulées de manière temporaire et dispersées.² Elles sont supposées être solides de l'extérieur jusqu'au cœur de la particule composées d'une couronne rigide entourant un cœur permettant l'encapsulation de substances. Les nanocapsules en revanche sont subdivisées en deux classes, en fonction de leur composition/structure. En effet, la nanocapsule peut être simplement composée d'une membrane de polymère (généralement du PLGA) ou bien composée d'une membrane de polymère (réticulée), mais possédant également un cœur ou matrice de polymères. Ces objets peuvent être comparés à des vésicules, car la cavité peut être hydrophobe ou hydrophile et à des micelles dans la mesure où ils présentent comme elles une structure cœur-couronne.^{21,184}

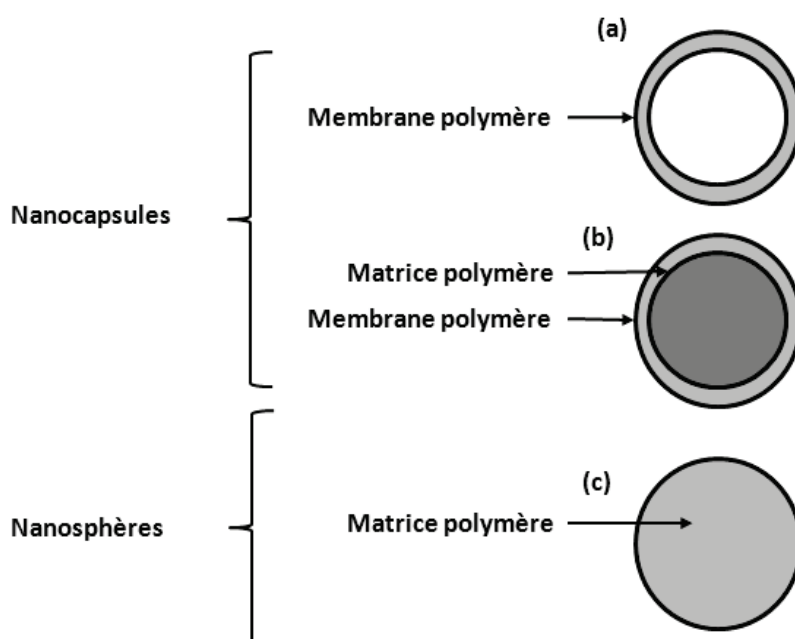


Figure I-18 Composition des nanosphères et nanocapsules¹⁸⁵

Ces deux types de nanoparticules à base de copolymères amphiphiles peuvent être préparés selon plusieurs méthodes évoquées précédemment (depuis la nanoprécipitation jusqu'à la double émulsion).^{186,177,187}

La dernière sous-catégorie brièvement introduite précédemment concerne les nanogels. Ceux-ci peuvent être obtenus à partir de chacune des nanoparticules. La particularité de cette famille d'objets réside dans le fait que soit le cœur, soit la couronne, soit l'intégralité du nano-objet est réticulé.¹⁸⁸ Le fait de réticuler une partie du copolymère amphiphile apportera une stabilité supplémentaire. Cette réticulation pourra se faire par des liaisons hydrogènes, des réactions de quaternisation, des réactions de chimie clic ou l'utilisation d'agents de réticulation.^{168,189}

3. Paramètres structuraux et caractérisations

Comme l'évoque Chu dès 1996, il existe une multitude de paramètres structuraux et autant de méthodes permettant de définir quels types d'objets sont formés.¹⁹⁰

Ci-dessous sont listés les principaux paramètres structuraux et rassemblés dans le Tableau I-6:

- La concentration micellaire critique (CMC) et la concentration d'agrégation (CAC) correspondent aux concentrations auxquelles se forment respectivement les micelles et agrégats de type micelle.
- La morphologie, qui est généralement sphérique, mais peut également être lamellaire, tubulaire...
- Le nombre d'agrégation (N_{ag}) correspond au nombre de chaînes de copolymères par micelle, ou nombre de chaînes hydrophobes constituant le cœur micellaire (donc différent selon l'architecture du copolymère amphiphile).
- Le diamètre de l'objet avec plus précisément :
 - le rayon de giration de la micelle (R_g) correspond à la moyenne quadratique des distances des unimères au centre de gravité de chaque micelle ;
 - le rayon hydrodynamique de la micelle (R_H) correspond à la taille effective de la micelle détectée à partir de son mouvement brownien ;
 - le rayon du cœur du système micellaire (R_c), constitué par les chaînes hydrophobes et éventuellement des molécules de solvant,
 - l'épaisseur de la couronne (L) constituée majoritairement de solvant et de chaînes hydrophiles.
 - le rayon de la micelle (R_m) correspond à la somme de (R_c) et (L)

L'ensemble de ces paramètres peut être déterminé par de nombreuses techniques expérimentales présentées dans le Tableau I-6 et décrites dans les paragraphes suivants.

Tableau I-6 Paramètres structuraux et techniques de caractérisation¹⁹¹

Techniques	Paramètres micellaires
Chromatographie d'exclusion stérique	R_H , dynamique des systèmes
Diffusion Dynamique de la lumière (DLS)	R_H , dynamique des systèmes
Diffusion Statique de la Lumière (SLS)	R_g , M_w , CMC, N_{ag} , R_H ,
Diffusion des neutrons aux petits angles Diffusion des rayons-X aux petits angles (SANS)	R_m , R_c , L , N_{ag} , dynamique des systèmes
Microscopie Electronique à Transmission (TEM)	Morphologie, taille, polydispersités en taille
Tensiométrie	CMC, CMT
Spectroscopie de fluorescence	CMC, CMT, dynamique des systèmes

a. Diamètres et Morphologies

Les premières techniques pour déterminer le diamètre des objets formés sont les mesures de diffraction ou dispersion. La diffraction de la lumière en mode dynamique (DLS) permet de déterminer le rayon hydrodynamique (R_H) des particules. Cette méthode donne des indices sur l'allure du profil de distribution des tailles de particules de l'échantillon en nombre, volume ou intensité. La diffraction de la lumière en mode statique (SLS), à la différence de la DLS, réalisée à plusieurs angles, permet de remonter au poids moléculaire des copolymères (M_w), et au rayon de gyration (R_g).^{192,193,194} Les méthodes de diffraction des rayons X (SAXS) ou des neutrons (SANS) sont semblables car elles utilisent toutes les deux des techniques de diffusion élastique aux petits angles. Ces deux techniques permettent de déterminer la structure, la forme et la taille de la macromolécule en donnant accès au rayon du cœur (R_c), à l'épaisseur de la couronne (L) et donc au rayon de la micelle (R_m).^{195,196}

La microscopie électronique à transmission (TEM) est une technique courante permettant de déterminer la morphologie et le diamètre des particules présentes dans l'échantillon étudié.¹⁹⁷ Une méthode supplémentaire et complémentaire est la cryo-TEM. En effet, l'avantage de cette technique-ci est qu'elle est représentative de l'échantillon dans son état hydraté, alors que la première technique s'effectue sur un échantillon déshydraté. Cependant, le problème inhérent de la cryo-TEM reste son coût et sa difficile accessibilité.

La microscopie à force atomique (AFM) est également une technique permettant de caractériser la surface des échantillons. La sonde mécanique de l'appareil mesure, à la surface de l'échantillon, les forces de type Van der Waals, électrostatique ou encore la composition de la surface. Différents modes sont accessibles - le contact statique, le contact intermittent et le mode sans contact - et

permettent l'accès à des images en trois dimensions à l'échelle nanométrique avec différentes propriétés. L'avantage d'une telle technique repose sur l'absence de contraintes pour la préparation des échantillons, opérant à température ambiante et sous pression atmosphérique.^{198,199}

Les avantages des techniques de diffraction de la lumière et de microscopie sont qu'elles sont communes à toutes les sous-catégories de la famille des nanoparticules.

b. Stabilité des nano-objets

La stabilité des micelles et des agrégats de type micelle peut être estimée à partir de la détermination de la concentration micellaire critique (CMC) ou de la concentration d'agrégation critique (CAC). Ces concentrations critiques sont définies comme les concentrations en deçà desquelles les espèces sont présentes sous la forme d'unimères en solution, et au-dessus desquelles les objets formés sont en équilibre avec les unimères (Figure I-19).²⁰⁰

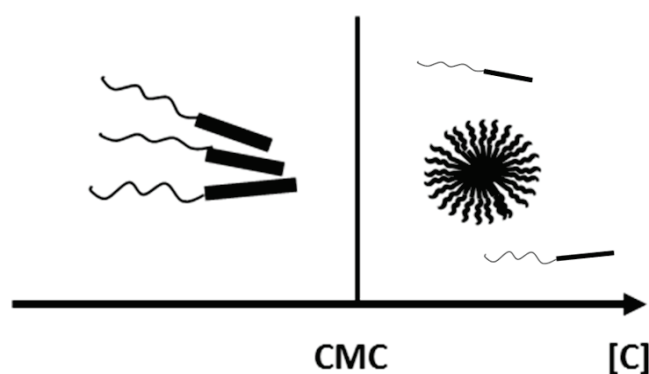


Figure I-19 Définition de la CMC

Ces concentrations critiques peuvent être déterminées par plusieurs techniques allant de la spectroscopie de fluorescence à la diffusion statique de la lumière en passant par la conductimétrie.

La conductimétrie est utilisée pour déterminer la concentration micellaire critique en suivant la loi de Kohlrausch. Brièvement, celle-ci, qui définit la conductivité comme $\sigma = \sum z_i \cdot \lambda_i \cdot c_i$, dans un régime dilué, implique que la conductivité variera en fonction de la concentration en copolymère [C]. La concentration micellaire critique sera déterminée au point de variation de pente sur le graphe de $\sigma=f(C)$, comme indiqué sur la Figure I-20A.^{201,202} Cette technique sera appliquée à des copolymères chargés en solution.

La spectroscopie de fluorescence repose sur l'utilisation d'une molécule de faible hydrosolubilité (2-3 μM) telle que le pyrène qui émet une fluorescence spécifique en fonction des interactions avec son environnement. Ainsi, lorsque les micelles sont formées, le pyrène se loge préférentiellement dans le

cœur hydrophobe des objets et émet un spectre d'émission de fluorescence caractéristique. La fluorescence mesurée à différentes concentrations en copolymère $[C]$ permet de déduire la concentration micellaire critique comme l'intersection de deux droites sur la Figure I-20B.²⁰³

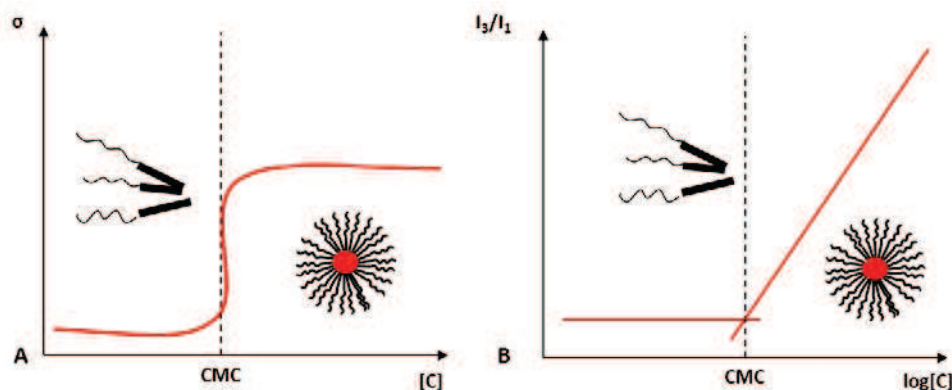


Figure I-20 Détermination de la concentration micellaire critique par conductimétrie (A) par fluorescence (B)

La diffusion de la lumière en mode statique et en mode dynamique permet également de déterminer la concentration micellaire critique ou concentration d'agrégation critique des micelles et agrégats de type micelles. Comme l'ont démontré Gracia *et al.*, un profil de diamètre et d'intensité est établi en fonction de la concentration et permet de définir la concentration micellaire critique comme sur la Figure I-21.²⁰⁴

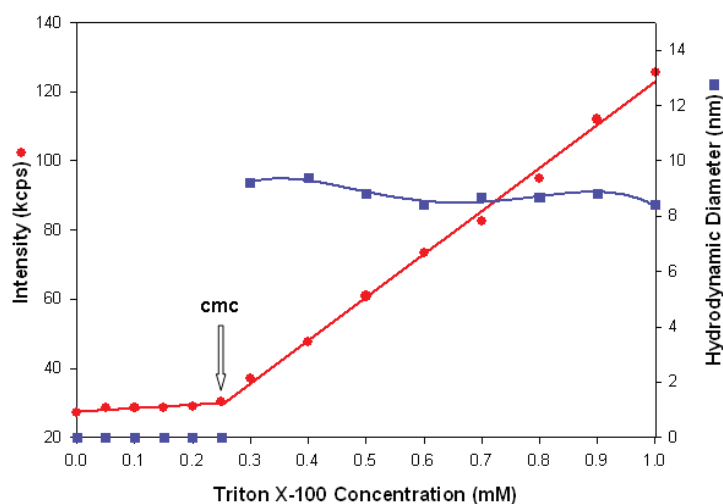


Figure I-21 Détermination de la concentration micellaire critique par diffusion dynamique de la lumière²⁰⁵

c. Composition

D'autres techniques spectroscopiques permettent de caractériser les nanoparticules : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie de diffusion par RMN (RMN DOSY) et la spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS). Les deux premières techniques, selon le solvant d'analyse

utilisé, permettront de mettre en évidence la structure visible, c'est-à-dire la composition de la couche extérieure de la nanoparticule. Par exemple, si des micelles sont formées en milieu aqueux et si les analyses ont lieu dans D₂O, seuls les signaux correspondant à la couche hydrophile seront visibles. Les composants du cœur hydrophobe étant inaccessibles, leurs signaux ne seront pas visibles avec ces techniques.²⁰⁶ La dernière technique, la spectroscopie photoélectronique aux rayons X, permet de déterminer la composition de surface des nano-objets étudiés.²⁰⁷ Cependant, pour cette dernière technique, l'échantillon aura également besoin d'être déshydraté.

4. Influence sur les paramètres structuraux

Nous venons de définir les propriétés des différentes familles de nano-objets que les copolymères amphiphiles peuvent former en milieu aqueux, en parallèle des paramètres structuraux et leurs techniques de caractérisation. Nous allons maintenant étudier les variables qui peuvent influencer sur ces paramètres structuraux et sur la conformation des auto-assemblages.

a. Nature des blocs

Attwood *et al.* démontrent l'importance de la nature des différents blocs. En effet, des copolymères amphiphiles à base de PEG et de polyester, de composition similaire, n'auront pas les mêmes propriétés en fonction de la nature du bloc polyester. Les copolymères à bloc à base de PLA ou de PCL ne forment pas, par auto-assemblage, des nano-objets identiques. En fonction de la nature du polyester et de ses propriétés (pouvoir hydrophobe, température de transition vitreuse T_g , cristallinité) l'auto-assemblage ne montre pas les mêmes propriétés physico-chimiques.¹⁵⁸

b. Longueur des blocs

La balance hydrophile-hydrophobe dépend de la composition du copolymère en unités hydrophiles et hydrophobes tout comme le paramètre d'empilement p . Ainsi, l'augmentation ou la diminution de la longueur (masse molaire) d'un des blocs modifie la balance HLB, le paramètre d'empilement p et donc les propriétés d'auto-assemblage du copolymère.¹⁹¹ Ce phénomène est illustré par le type de nano-objets micellaires obtenus, et par la détermination de la concentration micellaire critique des objets formés.

i. *Influence sur la morphologie de l'auto-assemblage*

Des micelles unimoléculaires peuvent être formées par des copolymères amphiphiles ayant un bloc hydrophobe de faible poids moléculaire, tandis que des copolymères amphiphiles ayant un bloc hydrophobe de plus haut poids moléculaire formeront des micelles plurimoléculaires avec une morphologie variable.

Lors de l'auto-assemblage de copolymères dibloc possédant un bloc hydrophile de haut poids moléculaire par rapport au bloc hydrophobe, des micelles de type « star-like » seront formées. À l'inverse, un copolymère dibloc possédant un bloc hydrophobe de plus haut poids moléculaire par rapport au bloc hydrophile formera des micelles de type « crew-cut » (Figure I-22).

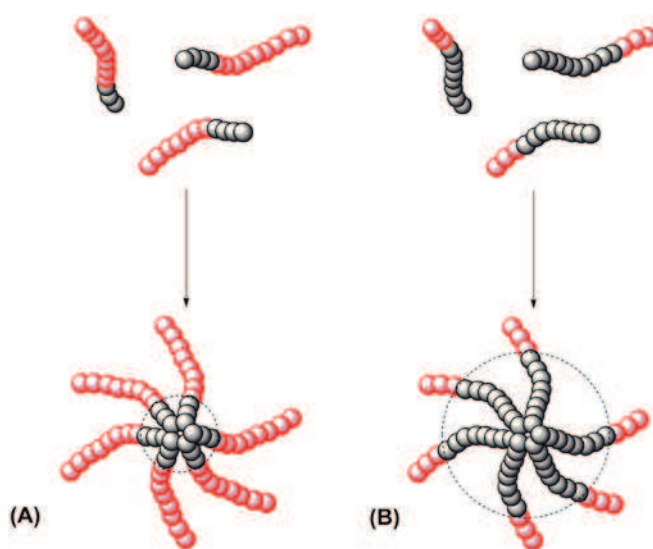


Figure I-22 (A) micelle "étoile" ; (B) micelle "crew-cut"
 bloc hydrophobe en noir et bloc hydrophile en rouge

Ces deux types de micelle sont également obtenus à partir de copolymères d'architectures différentes en fonction de la proportion en unités hydrophiles f_{EO} . Lorsque la proportion d'unités hydrophiles est supérieure à la proportion d'unités hydrophobes, les micelles obtenues sont du type « star-like », avec un cœur hydrophobe compact et des branches hydrophiles étendues. Lorsque la proportion d'unités hydrophiles est inférieure à la proportion d'unités hydrophobes, les micelles obtenues sont de type « crew-cut » avec un large cœur hydrophobe et une mince couronne hydrophile.²¹

Zhang *et al.* ont montré de manière similaire l'influence de f_{EO} sur un copolymère tribloc PCL-*b*-PEG-*b*-PCL de type BAB.¹⁸³ En effet, dans un cas, ils obtiennent des micelles (PCL₄₀₀₀-PEG₈₀₀₀-PCL₄₀₀₀, $f_{EO}=50\%$) ; dans l'autre ils obtiennent des polymersomes (PCL₈₀₀₀-PEG₈₀₀₀-PCL₈₀₀₀, $f_{EO}=33\%$). Il apparaît que l'augmentation de la proportion des unités caprolactone, diminue la proportion en unités éthylène oxyde f_{EO} , et favorise la formation de nanoparticules avec une membrane telles que les polymersomes.

La même équipe a mis en évidence, l'influence de ce même facteur sur la morphologie qu'adoptent des copolymères d'architectures différentes.²¹ Dans le cas où la proportion en unités hydrophiles éthylène oxide (f_{EO}) est inférieure à 25% des nanocapsules et des nanosphères sont formées. En revanche, pour une proportion en unités hydrophiles f_{EO} supérieure à 25%, des micelles sont formées. Au sein même de cette population, les deux types de micelles (étoile et « crew-cut ») définis précédemment peuvent également être formés (Figure I-22).

Discher *et al.* ont également mis en évidence l'impact de la longueur des blocs hydrophiles et hydrophobes sur la formation des nano-objets, et donc l'impact du paramètre d'empilement : une coexistence de micelles sphériques, micelles tubulaires et polymersomes géants est possible en fonction de leurs masses molaires (Figure I-23).^{208,209}

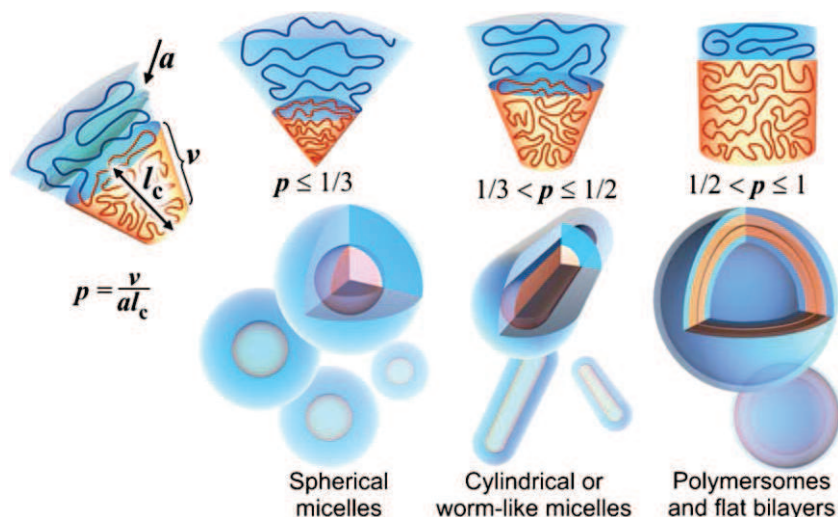


Figure I-23 Influence de la longueur des blocs et du paramètre p sur la morphologie des objets formés

ii. Influence sur la stabilité de l'auto-assemblage

Comme l'ont démontré Attwood *et al.*, la longueur (masse molaire) des différents blocs influe également sur les propriétés physico-chimiques des nano-objets formés comme la concentration micellaire critique, et donc la stabilité.¹⁵⁸ Pour une même masse molaire de bloc hydrophile, l'augmentation de la masse molaire du bloc hydrophobe stabilisera (CMC plus faible) l'objet formé en solution. À l'inverse, l'augmentation de la masse molaire du ou des blocs hydrophiles déstabilisera l'édifice et augmentera la CMC.

c. Composition et architecture

La composition et l'architecture des copolymères amphiphiles impactent l'assemblage et permettent de former des micelles « multicompartiments ». Dans le cas où nous mettons en présence trois types de copolymères ABC, où la chaîne A est hydrophile, et les chaînes B et C sont des polymères

hydrophobes incompatibles, on constatera que, selon la composition en A, B ou C et leurs architectures initiales (dibloc AB+AC, tribloc ABC ou BAC, miktoarm) on formera des micelles multicompartiments différentes.²¹⁰

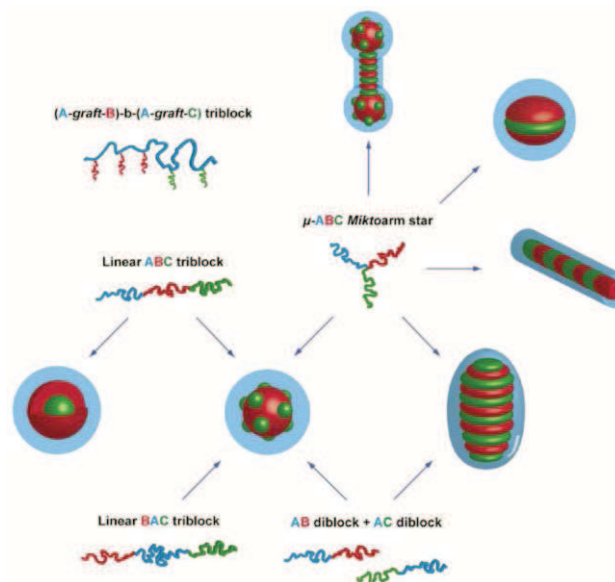


Figure I-24 Représentation Schématique des nano-objets en fonction de l'architecture initiale²¹⁰

De manière similaire, Zhang *et al.* ont mis en évidence l'influence de l'architecture sur la morphologie des objets formés.²¹ À partir de copolymères amphiphiles de type PEG-*b*-PLGA (A-B) dibloc (AB), tribloc (ABA et/ou BAB), multiblocs ((AB)_n), et étoile ils obtiennent des auto-assemblages de morphologies variées allant de la nanocapsules à la micelle (« crew-cut », « star-like » et « flower-like »).

L'architecture initiale est également mise en évidence par Essa *et al.* Ils comparent des copolymères amphiphiles à base de PLA et de PEG de types greffé et multiblocs linéaire et confirment qu'ils ne s'auto-assemblent pas de la même manière.¹³⁹

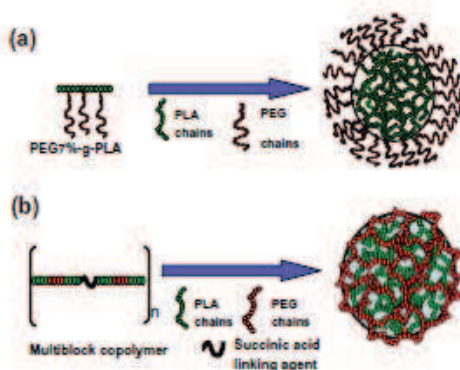


Figure I-25 Représentation Schématique des nano-objets en fonction de l'architecture initiale¹³⁹

d. Forces intermoléculaires

Enfin, les interactions intermoléculaires, comme les liaisons hydrophobes, les forces électrostatiques et les liaisons hydrogènes, agissent également sur l'architecture. Les interactions hydrophobes doivent être prises en compte car elles sont probablement les forces motrices de l'auto-assemblage, initiant l'agrégation des portions hydrophobes des copolymères au cœur du nano-objet, contribuant à diminuer l'entropie et donc à augmenter l'ordre au sein de la structure. Les liaisons hydrogène, qui peuvent être considérées comme une sous-partie des interactions électrostatiques, sont également responsables de la conformation de l'auto-assemblage. Ce genre de liaison pourra être responsable de la formation de micelles de type nanotubes ou « worm-like » mais leur quantification n'est pas aisée.¹⁶⁵

D. Application : Systèmes de délivrance contrôlée de principes actifs

L'encapsulation regroupe l'ensemble des technologies permettant la préparation de particules individualisées constituées d'un matériau contenant une matière active.

Les systèmes de délivrance de principes actifs existant à ce jour sont au nombre de six: les implants, les microparticules, les hydrogels, les prodrogues, les pompes osmotiques et les nanoparticules. Nous nous concentrerons sur les systèmes reposant sur les nanoparticules car ce sont les systèmes qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse, et nous décrirons brièvement les systèmes utilisant les prodrogues et les hydrogels afin de les comparer aux nanoparticules.

Ces systèmes peuvent être administrés selon deux différentes voies : entérale et parentérale, à visée locale ou générale. La voie d'administration concernée par les nanoparticules est la voie parentérale. En fonction du lieu d'injection (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire...), le cahier des charges du système médicamenteux sera différent.

1. Définitions

L'association de copolymères amphiphiles en milieu aqueux va nous donner des auto-assemblages. L'objectif de l'utilisation galénique de ce genre de système est d'améliorer la biodistribution et la biodisponibilité de PA tels que la doxorubicine, le paclitaxel, l'amphotéricine B ou encore la curcumine (Figure I-26) avec un ciblage passif ou actif.

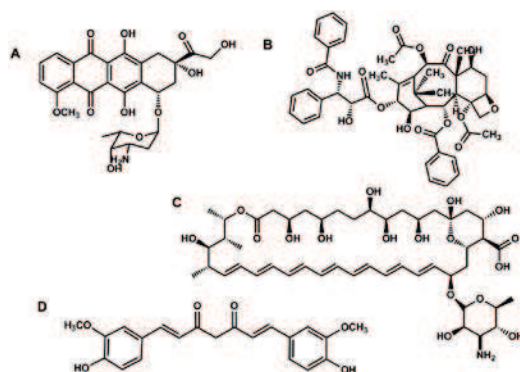


Figure I-26 (A) Doxorubicine (B) Paclitaxel (C) Amphotéricine B (D) Curcumine

Ces PA ont tous prouvé une efficacité thérapeutique. Le paclitaxel, par exemple, est un PA utilisé dans la thérapie anticancéreuse provoquant des effets toxiques sur la moëlle osseuse,²¹¹ et dont l'utilisation est limitée par sa faible hydrosolubilité (0.0225mg/L). Un adjuvant (le Chremophor EL®) et de l'éthanol sont donc utilisés actuellement pour le solubiliser. Cependant, cet adjuvant est responsable d'effets secondaires comme une toxicité rénale et neuronale. Il apparaît ici nécessaire d'utiliser des systèmes comme les auto-assemblages pour solubiliser et transporter ces PA jusqu'à leur cible sans dommages collatéraux et en préservant leur efficacité (Figure I-27).

Pour ce genre d'application, un cahier des charges précis doit être respecté :

- (1) Effets secondaires diminués voire supprimés
- (2) Réduction du nombre d'injections et coût réduit
- (3) Stabilité et augmentation de la durée de vie du principe actif et de son activité
- (4) Cinétique de libération prolongée, prévisible et reproductible

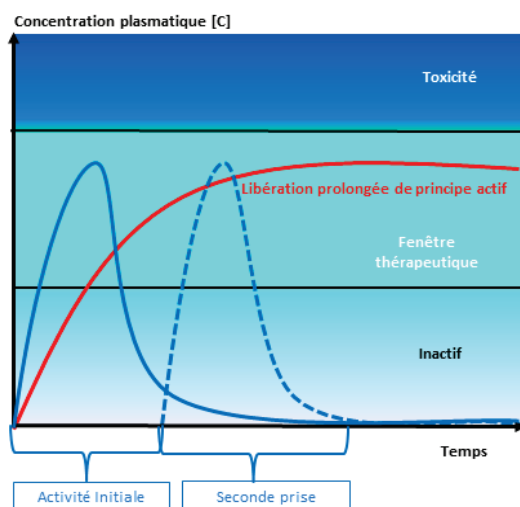


Figure I-27 Profil de libération depuis un système de délivrance de principes actifs (rouge) vs système normal (bleu)

Singh et Illard ont mis en évidence toutes les conditions requises pour la conception de tels systèmes, en évoquant le diamètre et les dimensions des auto-assemblages - qui doivent être suffisamment faibles pour permettre la circulation dans le réseau sanguin - et les propriétés de surface requises pour conférer de la furtivité et éviter ainsi une élimination trop rapide (Figure I-28).²¹²

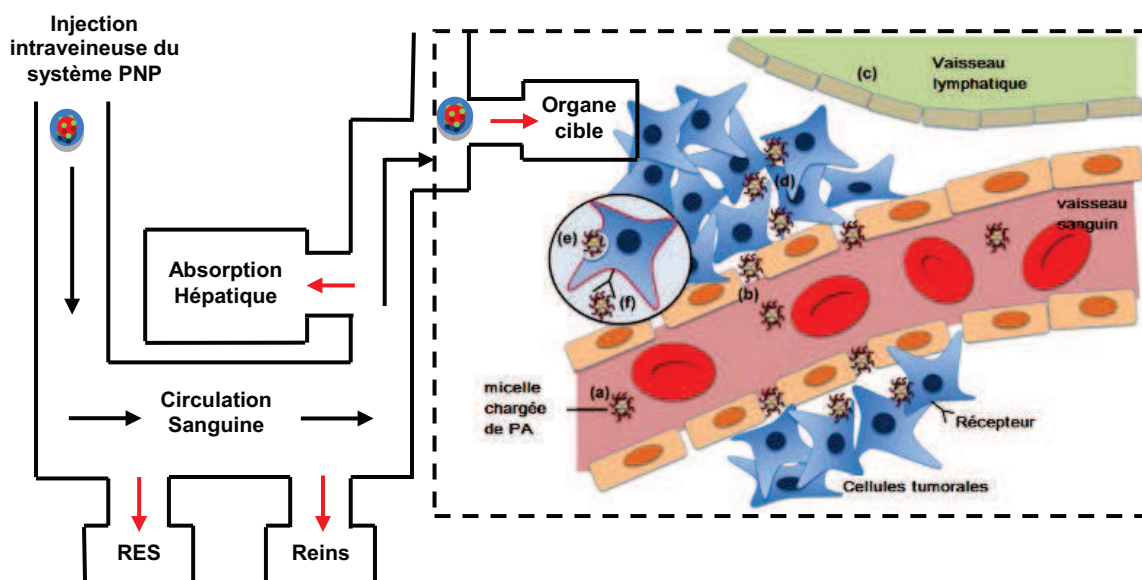


Figure I-28 Itinéraire d'un système NP après injection IV²¹³ et absorption par l'effet EPR²¹⁴

Dans le domaine précis de l'oncologie, il faut savoir que les tumeurs cancéreuses généralement visées par l'utilisation de paclitaxel ont une vascularisation sanguine importante (angiogénèse) associée à une grande perméabilité des capillaires sanguins (d'où le « enhanced permeability »). Par contre, elles n'ont pas de drainage lymphatique (d'où le « retention »). Ainsi, les nanoparticules encapsulant du paclitaxel sont en mesure de franchir les capillaires sanguins et de s'accumuler dans les tissus cancéreux. L'ensemble de ces deux phénomènes donne l'effet appelé EPR (enhanced permeability and retention) qui fournira un ciblage passif à nos systèmes de délivrance de PA^{215,216}

2. Auto-assemblages : encapsulation, transport, vectorisation et libération de molécules actives

De nombreux travaux relatifs à l'encapsulation et au transport de molécules actives (ou principes actifs) à base de copolymères amphiphiles sont retrouvés dans la littérature. L'influence de la nature des blocs, de la balance hydrophile/hydrophobe et de l'architecture est retrouvée au niveau des efficacités d'encapsulation des dites molécules, et influe sur leur comportement *in vivo*.

a. Encapsulation

Le phénomène d'encapsulation est déterminé selon deux paramètres : l'efficacité d'encapsulation (EE), et le taux de charge (DL). Ces deux données sont définies respectivement dans les équations 1.2 et 1.3 comme la ratio de la quantité de PA encapsulée sur la quantité de PA introduite initialement et le ratio de la quantité de PA encapsulée sur la quantité de nano-objets formés.

$$EE = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,initial}} \times 100 \quad \text{Eq. 1.2}$$

$$DL_M = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,enc} + m_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 1.3}$$

Kim *et al.* rapportent l'influence de la balance hydrophile/hydrophobe sur l'encapsulation de paclitaxel et sur le diamètre des nanosphères formées à base de copolymères amphiphiles à base de PEG et de PCL. En effet, ils constatent que plus la masse molaire du bloc hydrophobe augmente, plus la taille globale du nano-objet augmente ainsi que l'efficacité d'encapsulation.²¹⁷ Elsbahy *et al.* ont mis en évidence l'impact de la morphologie adoptée par l'auto-assemblage sur le taux d'encapsulation ou taux de charge. Ainsi, des copolymères amphiphiles de type « worm-like » ou filomicelles auront une meilleure efficacité d'encapsulation et un taux de charge plus élevé que ses homologues sphériques.²¹⁸ Liggins et Burt ont ensuite démontré l'importance de la technique de préparation des nano-objets et de la composition du cœur avec l'incorporation de paclitaxel au sein d'un copolymère dibloc composé de PEG et de polyesters. Ils arrivent ainsi à augmenter la solubilité du paclitaxel par un facteur de 5000 en utilisant la technique de « film-casting » dans l'acétonitrile, solvant qui élimine la présence de paclitaxel sous forme cristalline, et entraîne une meilleure solubilisation et une meilleure incorporation. De même, un cœur constitué d'un homopolylester et non de copolyesters aura un comportement viscoélastique plus élevé et permettra une meilleure encapsulation.²¹⁹ Kwon *et al.* ont également constaté que le polymère constituant le cœur de l'auto-assemblage pouvaient avoir différentes affinités avec les PA et influencer ainsi sur le taux d'encapsulation.²²⁰

b. Transport et comportement *in vivo*

L'impact de la longueur et de la densité des chaînes de PEG à la surface des nanoparticules sur la furtivité est un paramètre largement étudié. Ainsi, avec des nanoparticules dont la surface est couverte de PEG, on relèvera qu'une augmentation de la longueur des chaînes de PEG et une

certaine densité permet de diminuer l'adsorption de protéines, augmentant la circulation *in vivo*.²²¹ Dans un même registre, Sharma *et al.* ont mis en évidence l'impact des morphologies de type sphériques, ellipsoïdales prolates (axe polaire plus grand que le diamètre équatorial) et oblates (axe polaire plus petit que le diamètre équatorial) sur la capacité à éviter l'attachement et l'internalisation par les macrophages. Ainsi, les morphologies de types ellipsoïdales sont les moins phagocytées, ce qui prolonge le temps de circulation.²²²

Un autre PA, la curcumine qui est un composé prometteur pour de nombreuses applications dont la thérapie anti-cancéreuse peut être encapsulée par un système à base de PCL et PEG. Si ce système provoque le même effet cytotoxique sur certaines cellules que la curcumine seule, il démontre une cinétique de libération prolongée et contrôlée à l'inverse de la curcumine seule.²²³ Song *et al.* confirment ce comportement avec des systèmes tribloc à base de PLGA et de PEG (PLGA-*b*-PEG-*b*-PLGA), mettant en évidence une absorption fortement diminuée par les reins et le foie.²²⁴

Tous ces systèmes sont des moyens de transport efficaces des principes actifs : ils améliorent la biodistribution et la biodisponibilité du principe actif sans entraver son efficacité une fois les cellules visées atteintes, et permettent également un relargage contrôlé et continu. Cependant, dans tous les cas cités, le ciblage est principalement passif.

c. Ciblage & Vectorisation : Bioconjugués et Chimère

Les objectifs des systèmes de délivrance de PA, en plus de transporter et stabiliser le PA, sont d'éviter d'éventuels effets secondaires en amenant le principe actif au plus près des organes, tissus et cellules, éventuellement organites visés. Pour cela, des stratégies de ciblage, vectorisation et suivi de nos systèmes doivent être mis en place. Ces stratégies permettront de minimiser les dégâts liés à une absorption ou une accumulation dans des tissus non visés.²²⁵ Ainsi, l'association ou la conjugaison à des molécules se fixant aux cellules cancéreuses, lors de l'encapsulation d'anti-cancéreux, permettra de s'assurer de l'action du principe actif sur les cellules voulues et non sur des cellules saines.^{226,227} Ces différentes molécules devront donc être « attachées » au squelette/branches du copolymère synthétisé en fonction de l'effet recherché. Ce couplage pourra être effectué selon diverses stratégies de ligation chimique, dont quelques-unes sont évoquées par Goldman *et al.*²²⁸

Dans le cadre d'une stratégie de ciblage des cellules cancéreuses, plusieurs molécules pourront être liées, comme l'acide folique ou vitamine B9, la biotine, ou encore le mannose (Figure I-29).

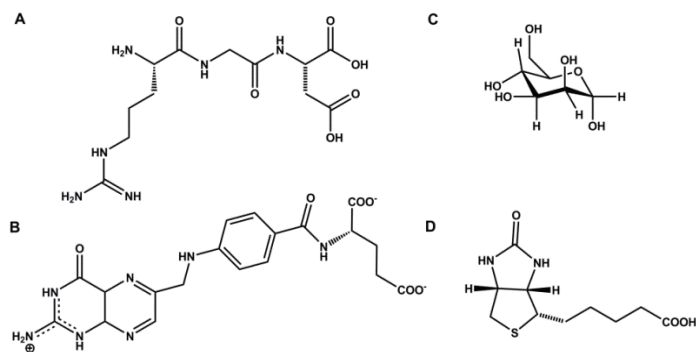


Figure I-29(A) Peptide RGD (B) Vitamine B9 ou acide folique (C) Mannose (D) Biotine

Ce genre de molécules permettra une ligation à la surface des cellules cancéreuses, voire une internalisation via la réaction avec des récepteurs spécifiques surexprimés à la surface de ces cellules rapprochant au plus près le principe actif de son objectif (Figure I-30).²²⁹

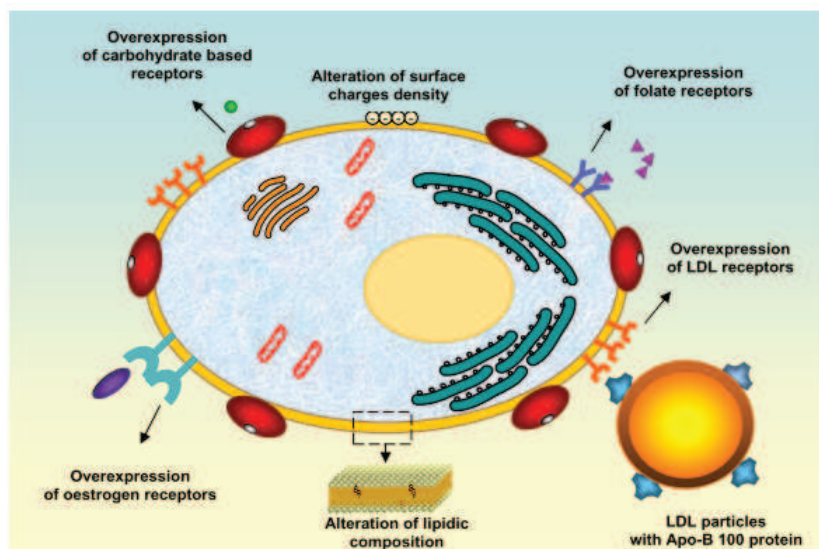


Figure I-30 Schéma de composition d'une cellule cancéreuse²³⁰

Ainsi, la fonctionnalisation par couplage covalent de l'acide folique (Figure I-29B) à l'extrémité des chaînes de polymères hydrophiles permettra, lors de l'auto-assemblage que celui-ci soit présent sur la couronne extérieure et participe effectivement au ciblage, en interagissant avec un récepteur spécifique (dans ce cas le récepteur folate).^{231,232-234} Ce genre de système fonctionnalisé révèle *in vitro* une cytotoxicité plus élevée et une viabilité des cellules cancéreuses plus faible par comparaison avec des copolymères à blocs non fonctionnalisés, encapsulant également du paclitaxel.^{232,233}

Une autre manière de cibler les cellules cancéreuses passe par la ligation avec des peptides. Le peptide RGD par exemple (Figure I-29A) peut être lié sous forme linéaire ou cyclique sur l'extrémité

PEG d'un copolymère PEG-*b*-PLA pour que le peptide soit proche de la surface de la couronne hydrophile. Le système encapsulant du paclitaxel prouve, via des tests cellulaires *in vitro*, que le complexe se lie à la surface des cellules cancéreuses par un récepteur : l'intégrine. De plus, après marquage fluorescent du système, ils constatent qu'il y a bien accumulation du composé dans les tissus cancéreux, et très peu ailleurs ou encore en circulation, preuve d'un ciblage efficace.^{235–237} Une autre famille de peptides, les « cell penetrating peptides » ou CPP, peut être liée à des copolymères pour améliorer la vectorisation. En effet, des copolymères de type PLA-*b*-PEG encapsulant de la doxorubicine et présentant ces CPP pénétreront sélectivement les cellules cancéreuses en fonction du pH plus acide dans l'environnement de celles-ci et permettront une meilleure internalisation du principe actif et la mort cellulaire.²³⁸

Il existe également des méthodes de fonctionnalisation des nanoparticules permettant de les suivre après injection. Droumaguet *et al.* rapportent d'ailleurs la fonctionnalisation de nanoparticules avec la rhodamine B, permettant ainsi de visualiser l'internalisation des nanoparticules après injection.^{226,239–241}

d. Mécanisme de libération de principes actifs

De nombreux mécanismes existent pour la libération de principes actifs. On distinguera deux catégories de mécanismes, les passifs et les actifs.

Par la terminologie passive sera défini un mécanisme de diffusion/perméation ou de dégradation, illustré sur la Figure I-31.¹⁷⁶

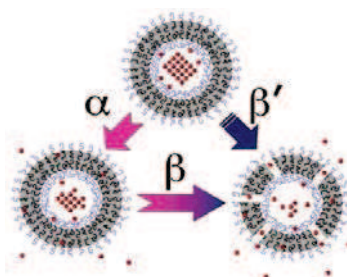


Figure I-31 Illustration des mécanismes de traversée et de dégradation depuis un polymersome²⁴²

On assistera principalement à une libération par la traversée des différentes couches de polymères (α sur la Figure I-31) avec des cinétiques lentes et contrôlées. La libération de principes actifs pourra également avoir lieu avec la « destruction » ou dégradation des différentes couches. Comme évoqué précédemment, un cœur PLA ou PLGA sera plus rapidement biodégradé qu'un cœur PCL, d'où il résultera une libération plus rapide du principe actif.¹²

L'intervention de stimuli externes responsables de la libération de principes actifs constitue la catégorie des mécanismes de libération actifs. Ces stimuli externes pourront être des variations de pH ou de température.

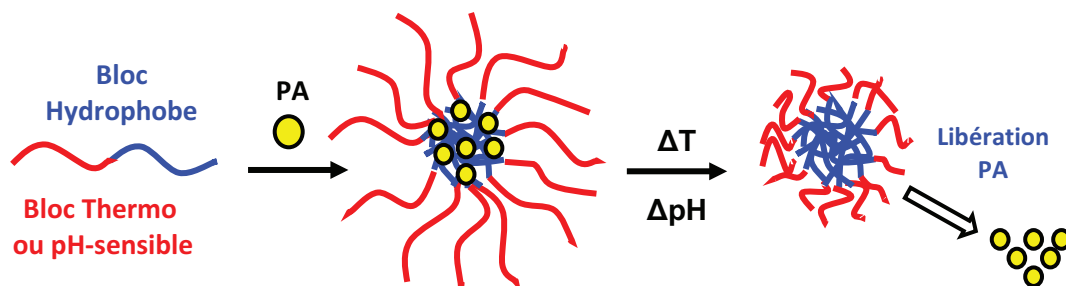


Figure I-32 Illustration de mécanismes actifs pour la libération de PA

Lorsque le copolymère amphiphile sera constitué de segments pouvant répondre à des stimuli extérieurs, comme le poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol)) (PEGMA), on assistera à une modification ou une désintégration de l'auto-assemblage en solution, dont résultera l'expulsion du principe actif du cœur hydrophobe.^{152,243–245}

3. Autres systèmes de délivrance de principes actifs utilisant une matrice polymère

a. Prodrogue

La prodrogue, à la différence des auto-assemblages listés précédemment, repose sur une liaison covalente avec le système polymérique qui l'entoure. Dans ce genre de système, il y aura juste besoin de conditions spécifiques au niveau des tissus visés pour rompre cette liaison. Quelques travaux ont été réalisés sur cette thématique avec la doxorubicine, notamment via une liaison hydrazone, qui peut être facilement clivée une fois les cellules tumorales atteintes, à pH acide (Schéma I-37). Il s'agit d'une métabolisation *in vivo* qui permet de libérer le principe actif, qui exprime alors toute son activité. L'intérêt de tels systèmes est de faciliter l'internalisation des molécules actives tout en évitant leur dégradation avant d'atteindre la cible.^{246–248}

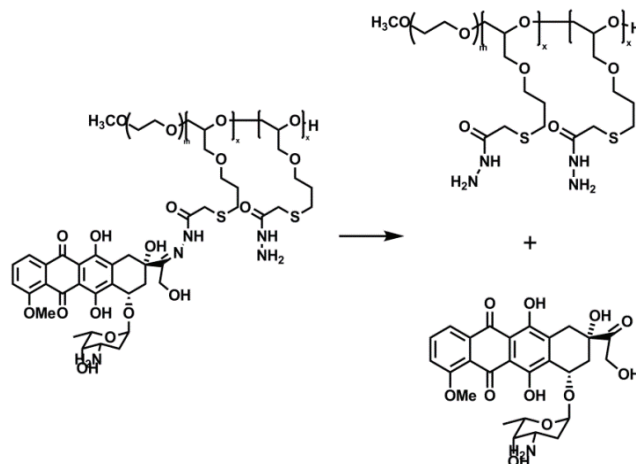


Schéma I-37 Clivage de la liaison hydrazone et libération de la doxorubicine

b. Hydrogels

Les hydrogels sont des systèmes tridimensionnels de réseaux polymériques reliés entre eux par réticulation physique (liaisons secondaires de type ionique ou hydrogène) ou chimique (liaisons covalentes), et de ce fait non solubles.²⁴⁹ Une catégorie d'hydrogels intermédiaires sera caractérisée par une combinaison de ces deux types de réticulation. Ces systèmes possèdent la capacité de s'hydrater fortement, donc de « gonfler ». Leur forte teneur en eau et leur consistance les font ressembler à des tissus natifs et les rend biocompatibles pour les applications visées. Ces réseaux peuvent être composés d'homo-, de co- ou de multi-polymères.²⁵⁰ Leur comportement variera en fonction de leur environnement. Dans ce genre de système, le PA pourra être encapsulé au sein du réseau de polymère et sera relargué en fonction des conditions physiologiques.²⁵¹

Conclusion

Dans le cadre d'applications thérapeutiques telles que la délivrance de PA, l'utilisation de polymères biocompatibles apparaît essentielle. De tels polymères doivent être capables d'incorporer des PA au cœur des nano-objets qu'ils forment en milieu aqueux.

Ainsi, les copolymères amphiphiles, constitués de polymères hydrophiles et hydrophobes, biodégradables et/ou bioéliminables, sont exploités pour générer le type de nano-objets requis. Différentes stratégies existent pour synthétiser ces copolymères amphiphiles aujourd'hui, et permettent la création d'architectures variées.

Parmi les architectures existantes, les copolymères amphiphiles de type greffés inverses et peigne présentent l'avantage de pouvoir moduler la balance hydrophile/hydrophobe selon plus de

paramètres, par rapport à leurs homologues linéaires à blocs. De plus, l'auto-assemblage en milieu aqueux de tels copolymères amphiphiles forme différents nano-objets impactant l'application visée.

Nous allons donc nous intéresser dans cette thèse à la synthèse de copolymères amphiphiles à base de polyesters aliphatiques biodégradables tel que le PLA, et de polyéther bioéliminable tel que le PEG, car ce sont des polymères biocompatibles dans le cadre de la confection de systèmes de délivrance de PA.

Plusieurs architectures ont été synthétisées, avec des copolymères greffés, des copolymères peigne di et tribloc. Le potentiel des différentes architectures à encapsuler des PA a été évalué.

La synthèse de copolymère greffé possédant un squelette hydrophobe polyester et des branches hydrophiles polyéther sera relatée dans le chapitre 2. La synthèse d'un monomère fonctionnel a été requise pour obtenir un squelette polyester fonctionnel, et procéder ensuite à des réactions de greffage de type « grafting onto » avec des branches de PEG fonctionnalisées en extrémité de chaîne. Le comportement auto-associatif en milieu aqueux de telles architectures a été étudié et des études préliminaires d'encapsulation de PA modèles ont été réalisées.

Dans le chapitre 3, la synthèse de copolymères amphiphiles de type peigne sera décrite. Nous avons synthétisé des copolymères peigne tribloc possédant un bloc central PLA hydrophobe, et deux blocs latéraux de branches polyéthers hydrophiles en combinant polymérisation par ouverture de cycle et polymérisation radicalaire contrôlée. Des copolymères peigne dibloc ont également été synthétisés, et les propriétés d'auto-assemblage en milieu aqueux seront discutées. La capacité de ces systèmes à encapsuler un PA a été évaluée avec les deux systèmes et des études préliminaires de libération de PA ont été réalisées.

Dans un dernier chapitre, nous nous intéresserons à la fonctionnalisation de copolymères amphiphiles afin d'amener des propriétés de vectorisation ou d'activité *in vivo*. Un copolymère peigne tribloc analogue au copolymère synthétisé dans le chapitre 3 sera ainsi fonctionnalisé et couplé à un composé modèle, la rhodamine. Ensuite, le couplage d'un peptide - ayant des propriétés immunostimulantes - sur un copolymère amphiphile dibloc a été réalisé. L'activité de ce système, encapsulant un PA a été étudiée et comparé à d'autres systèmes. Cette stratégie de couplage, effectuée sur un copolymère dibloc pourra être envisagée sur des copolymères présentant une architecture différente.

E. Bibliographie

1. Rowan, S. J. Polymer self-assembly: Micelles make a living. *Nat. Mater.* **8**, 89–91 (2009).
2. Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*. *Pure Appl. Chem.* **84**, 377–410 (2012).
3. Ikada, Y., Tsuji, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 117–132 (2000).
4. Holland, S. J., Tighe, B. J. polymers for biodegradable medical devices: 1. the potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Release* **4**, 155–180 (1986).
5. Nair, L. S., Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
6. Labet, M., Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484–504 (2009).
7. Chasin, M., Langer, R. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. (1990).
8. Qian, Z. Y. Wei, X.W.W., Gong, C. Y. Y., Gou, M. Y., Fu, S. Z., Guo, Q. F., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L.Y. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **381**, 1–18 (2009).
9. Lu, F. Lei, L., Shen, Y-Y., Hou, J-W., Chen, W-L., Li, Y-G., Guo, S-R. Effects of amphiphilic PCL-PEG-PCL copolymer addition on 5-fluorouracil release from biodegradable PCL films for stent application. *Int. J. Pharm.* **419**, 77–84 (2011).
10. Annabi, N., Fathi, A., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Dehghani, F. Fabrication of porous PCL/elastin composite scaffolds for tissue engineering applications. *J. Supercrit. Fluids* **59**, 157–167 (2011).
11. Enamul Hoque, M., Teh Hooi Meng, T., Leng Chuan, Y., Chowdhury, M., Prasad, R. G. S. V. Fabrication and characterization of hybrid PCL/PEG 3D scaffolds for potential tissue engineering applications. *Mater. Lett.* **131**, 255–258 (2014).
12. Sisson, A. L., Ekinici, D., Lendlein, A. The contemporary role of epsilon-caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer* **54**, 4333–4350 (2013).
13. Rasal, R. M., Janorkar, A. V., Hirt, D. E. Poly(lactic acid) modifications. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 338–356 (2010).
14. Leonard, M., Rouzes, C., Durand, A., Dellacherie, E. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **32**, 125–135 (2003).

15. Carrasco, F., Pagès, P., Gámez-Pérez, J., Santana, O. O., MasPOCH, M. L. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 116–125 (2010).
16. Lim, L.-T., Auras, R., Rubino, M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Prog. Polym. Sci.* **33**, 820–852 (2008).
17. Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R., John, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour. Technol.* **101**, 8493–8501 (2010).
18. Raquez, J. M., Habibi, Y., Murariu, M., Dubois, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1504–1542 (2013).
19. Vert, M. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Die Angew. Makromol. Chemie* **166/167**, 155–168 (1989).
20. Gupta, A. P., Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique. *Eur. Polym. J.* **43**, 4053–4074 (2007).
21. Zhang, K. Tang, X., Zhang, J., Lu, W., Lin, X., Zhang, Y., Tian, B., Yang, H., He, H. PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug delivery applications. *J. Control. Release* **183**, 77–86 (2014).
22. Gilding, D. K., Reed, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic / poly (lactic acid) homo- and copolymers : 1. *Polymer* . **20**, 1459–1464 (1979).
23. Wischke, C., Schwendeman, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* **364**, 298–327 (2008).
24. Vert, M., Schwach, G., Engel, R., Coudane, J. Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers? *J. Control. Release* **53**, 85–92 (1998).
25. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J M., Coco, R., Le Breton, A., Preat, V . PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 505–522 (2012).
26. Jérôme, C., Lecomte, P. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1056–1076 (2008).
27. Robert, J. L., Aubrecht, K. B. Ring-opening polymerization of lactide to form a biodegradable polymer. *J. Chem. Educ.* **85**, 258 (2008).
28. Schwach, G., Coudane, J., Engel, R., Vert, M. More about the polymerization of lactides in the presence of stannous octoate. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **35**, 3431–3440 (1997).
29. Wu, J., Pan, X., Tang, N., Lin, C.-C. Synthesis, characterization of aluminum complexes and the application in ring-opening polymerization of l-lactide. *Eur. Polym. J.* **43**, 5040–5046 (2007).
30. Ropson, N., Dubois, P., Jérôme, R., Teyssié, P. Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 17. Cryometric and viscosimetric analysis of the species active in the ring-

- opening polymerization of lactones, lactides, and cyclic anhydrides as initiated by aluminium triisopropoxide. *Macromol. Symp.* **27**, 5950–5956 (1994).
31. Wang, Y., Ma, H. Aluminum complexes of bidentate phenoxy-amine ligands: Synthesis, characterization and catalysis in ring-opening polymerization of cyclic esters. *J. Organomet. Chem.* **731**, 23–28 (2013).
 32. Huang, T.-L., Chen, C.-T. Aluminium complexes containing pyrazolyl–phenolate ligands as catalysts for ring opening polymerization of ϵ -caprolactone. *J. Organomet. Chem.* **725**, 15–21 (2013).
 33. Eguiburu, J. L., Roma, J. S. Ring opening polymerisation of L-lactide initiated by oxyethyl methacrylate – aluminium trialkoxides Part 2 . End groups exchange. *Polymer* . **41**, 6439–6445 (2000).
 34. Leemhuis, M. Nostrum, C F V., Kruijtzter, J A W., Zhong, Z Y., Breteler, M R., Dijkstra, P J., Feijen, J., Hennink, W E. Functionalized poly (R-hydroxy acid)s via ring-opening polymerization : toward hydrophilic polyesters with pendant hydroxyl groups. *Macromolecules* **39**, 3500–3508 (2006).
 35. Kricheldorf, H. R., Eggerstedt, S. Macrocycles 2a Living macrocyclic polymerization of ϵ -caprolactone with 2,2-butyl-2-stanna-1,3-dioxepane as initiator. *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 283–290 (1998).
 36. Kohn, F. E., Van Ommen, J. G., Feijen, J. The mechanism of the ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Eur. Polym. J.* **19**, 1081–1088 (1983).
 37. Porter, A. K. *Ring opening polymerization of lactide for the synthesis of poly(Lactic Acid)*. 25–32 (2006).
 38. Gerhardt, W. W., Noga, D. E., Hardcastle, K. I., García, A. J., Collard, D. M., Weck, M. Functional lactide monomers: methodology and polymerization. *Biomacromolecules* **7**, 1735–1742 (2006).
 39. Libiszowski, J., Kowalski, A., Duda, A., Penczek, S., Studies, M. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with covalent metal carboxylates , 5 a end-group studies in the model ϵ -caprolactone and L, L-dilactide/tin(II) and zinc octoate / butyl alcohol systems. *Macromol. Chem. Phys.* **203**, 1694–1701 (2002).
 40. Arvanitoyannis, I., Nakayama, A., Kawasaki, N., Yamamoto, N. Novel star-shaped polylactide with glycerol using stannous octoate or tetraphenyl tin as catalyst: 1. Synthesis, characterization and study of their biodegradability. *Polymer* . **36**, 2947–2956 (1995).
 41. Arvanitoyannis, I., Nakayama, A., Kawasaki, N., Yamamoto, N. Novel polylactides with aminopropanediol or aminohydroxymethylpropanediol using stannous octoate as catalyst; synthesis, characterization and study of their biodegradability: 2. *Polymer* . **36**, 2271–2279 (1995).
 42. Wu, J., Yu, T., Chen, C., Lin, C. Recent developments in main group metal complexes catalyzed/initiated polymerization of lactides and related cyclic esters. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 602–626 (2006).

43. Wu, J.-C., Huang, B.-H., Hsueh, M.-L., Lai, S.-L., Lin, C.-C. Ring-opening polymerization of lactide initiated by magnesium and zinc alkoxides. *Polymer* . **46**, 9784–9792 (2005).
44. Piao, L., Deng, M., Chen, X., Jiang, L., Jing, X. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and l-lactide using organic amino calcium catalyst. *Polymer* . **44**, 2331–2336 (2003).
45. Yuan, M., Li, X., Xiong, C., Deng, X. Polymerization of lactides and lactones 5. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and dl-lactide by rare earth 2-methylphenyl samarium. *Eur. Polym. J.* **35**, 2131–2138 (1999).
46. Deng, X. M., Yuan, M. L., Xiong, C. D., Li, X. H. Polymerization of lactides and lactones. II. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and DL -lactide by organoacid rare earth compounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **71**, 1941–1948 (1999).
47. Deng, X., Yuan, M., Li, X., Xiong, C. Polymerization of lactides and lactones VII . Ring-opening polymerization of lactide by rare earth phenyl compounds. *Eur. Polym. J.* **36**, 4–9 (2000).
48. Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., Li, X. Polymerization of lactides and lactones. IV. Ring-opening polymerization of ϵ -Caprolactone by rare earth phenyl compounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 1401–1408 (1998).
49. Kiesewetter, M. K., Shin, E. J., Hedrick, J. L., Waymouth, R. M. Organocatalysis: opportunities and challenges for polymer synthesis. *Macromolecules* **43**, 2093–2107 (2010).
50. Kamber, N. E., Jeong, W., Waymouth, R. M., Pratt, R.C., Lohmeijer, B.G.G., Hedrick, J. L.. Organocatalytic ring-opening polymerization. *Chem. Rev.* **107**, 5813–5840 (2007).
51. Nederberg, F., Connor, E. F., Moller, M., Glauser, T., Hedrick, J. L. New paradigms for organic catalysts: The first organocatalytic living polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 2712–2715 (2001).
52. Martello, M. T., Burns, A., Hillmyer, M. Bulk ring-opening transesterification polymerization of the renewable δ -decalactone using an organocatalyst. *ACS macroletters* **1**, 131–135 (2012).
53. Miao, Y., Rousseau, C., Mortreux, A., Martin, P., Zinck, P. Access to new carbohydrate-functionalized polylactides via organocatalyzed ring-opening polymerization. *Polymer* . **52**, 5018–5026 (2011).
54. Du Boullay, O. T., Saffon, N., Diehl, J.-P., Martin-Vaca, B., Bourissou, D. Organo-catalyzed ring opening polymerization of a 1,4-dioxane-2,5-dione deriving from glutamic acid. *Biomacromolecules* **11**, 1921–1929 (2010).
55. Bonduelle, C., Martín-Vaca, B., Cossío, F. P., Bourissou, D. Monomer versus alcohol activation in the 4-dimethylaminopyridine-catalyzed ring-opening polymerization of lactide and lactic O-carboxylic anhydride. *Chem. A Eur. J.* **14**, 5304–5312 (2008).
56. Connor, E. F., Nyce, G. W., Myers, M., Möck, A., Hedrick, J. L. First example of N-heterocyclic carbenes as catalysts for living polymerization: organocatalytic ring-opening polymerization of cyclic esters. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 914–915 (2002).

57. Dove, A. P. Pratt, R. C., Lohmeijer, B.G.G., Culkin, D.A., Hagberg, E.C., Nyce, G.W., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L. N-Heterocyclic carbenes: Effective organic catalysts for living polymerization. *Polymer* . **47**, 4018–4025 (2006).
58. Lohmeijer, B., Pratt, R., Leibfarth, F. Guanidine and amidine organocatalysts for ring-opening polymerization of cyclic esters. *Macromolecules* **39**, 8574–8583 (2006).
59. Kieseewetter, M. K., Scholten, M.D., Kirn, N., Weber, R.L., Hedrick, J.L., Waymouth, R.M.. Cyclic guanidine organic catalysts: what is magic about triazabicyclodecene? *J. Org. Chem.* **74**, 9490–9496 (2009).
60. Coles, M. P. Bicyclic-guanidines, -guanidates and -guanidinium salts: wide ranging applications from a simple family of molecules. *Chem. Commun.* 3659–3676 (2009).
61. Chuma, A. Horn, H.W., Swope, W.C., Pratt, R.C., Zhang, L., Lohmeijer, B.G.G., Wade, C.G., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L.. The reaction mechanism for the organocatalytic ring-opening polymerization of L-lactide using a guanidine-based catalyst: hydrogen-bonded or covalently bound? *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6749–6754 (2008).
62. Pratt, R. C., Lohmeijer, B. G. G., Long, D. a, Waymouth, R. M., Hedrick, J. L. Triazabicyclodecene: a simple bifunctional organocatalyst for acyl transfer and ring-opening polymerization of cyclic esters. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4556–4557 (2006).
63. Müller, A. H., Matyjaszewski, K. *Controlled and living polymerizations*. (Wiley-VCH, 2009).
64. Thompson, M. S., Vadala, T. P., Vadala, M. L., Lin, Y., Riffle, J. S. Synthesis and applications of heterobifunctional poly(ethylene oxide) oligomers. *Polymer* . **49**, 345–373 (2008).
65. Říhová, B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **21**, 157–176 (1996).
66. Rayeroux, D. Polymérisation Radicalaire Contrôlée Par Transfert d ' Iode En Mode Inverse (RITP) : Synthèse De Copolymères Amphiphiles. (2012).
67. Zhao, J., Pahovnik, D., Gnanou, Y., Hadjichristidis, N. Sequential polymerization of ethylene oxide, ε-caprolactone and L-lactide: a one-pot metal-free route to tri- and pentablock terpolymers. *Polym. Chem.* **5**, 3750 (2014).
68. Riley, T., Stolnik, S., Heald, C.R., Xiong, C.D., Garnett, M.C., Illum, L., Davis, S.S., Purkiss, S.C., Barlow, R.J., Gellert, P.R. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir* **17**, 3168–3174 (2001).
69. Choochottiros, C., Park, E., Chin, I. J. Synthesis and characterization of polylactide-poly(methyl methacrylate) copolymer by combining of ROP and AGET ATRP. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**, 993–1000 (2012).
70. Saeed, A. O., Dey, S., Howdle, S. M., Thurecht, K. J., Alexander, C. One-pot controlled synthesis of biodegradable and biocompatible co-polymer micelles. *J. Mater. Chem.* **19**, 4529 (2009).

71. Agut, W., Taton, D., Lecommandoux, S. A versatile synthetic approach to polypeptide based rod-coil block copolymers by click chemistry. *Macromolecules* **40**, 5653–5661 (2007).
72. Gregory, A., Stenzel, M. H. Complex polymer architectures via RAFT polymerization: From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 38–105 (2012).
73. Mespouille, L. Vachaud, M., Suriano, F., Gerbaux, P., Van Camp, W., Coulembier, O., Degée, P., Flammang, R., Du Prez, F., Dubois, P.. Controlled synthesis of amphiphilic block copolymers based on polyester and poly(amino methacrylate): Comprehensive study of reaction mechanisms. *React. Funct. Polym.* **68**, 990–1003 (2008).
74. He, G. S., Ma, L. L., Pan, J., Venkatraman, S. ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: A comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *Int. J. Pharm.* **334**, 48–55 (2007).
75. Li, S. M., Yang, L., Wu, X. H., Liu, F., Duan, Y. R. Novel biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs. *Pharm. Res.* **26**, 2332–2342 (2009).
76. Rostamizadeh, K., Asadi, H., Salari, D., Hamidi, M. Preparation and characterization of tri-block poly(lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(lactide) nanogels for controlled release of naltrexone. *Int. J. Pharm.* **416**, 356–364 (2011).
77. Mothe, C. G., Azevedo, A. D., Drumond, W. S., Wang, S. H., Sinisterra, R. D. Preparation and characterization of poly(L,L-lactide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L,L-lactide) (PLLA-PEG-PLLA) microspheres having encapsulated tetracycline. *J. Therm. Anal. Calorim.* **106**, 671–677 (2011).
78. Venkatraman, S. S., Jie, P., Min, F., Freddy, B. Y. C., Leong-Huat, G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int. J. Pharm.* **298**, 219–232 (2005).
79. Messman, J. M., Scheuer, A. D., Storey, R. F. Synthesis and characterization of A–B–A triblock copolymers derived from chloro-telechelic poly(l-lactide): combining ring-opening polymerization (ROP) and atom transfer radical polymerization (ATRP). *Polymer* . **46**, 3628–3638 (2005).
80. Motala-Timol, S., Jhurry, D. Synthesis of PDMAEMA–PCL–PDMAEMA triblock copolymers. *Eur. Polym. J.* **43**, 3042–3049 (2007).
81. Wu, X., Li, S., Coumes, F., Darcos, V., Lai Kee Him, J., Bron, P.. Modeling and self-assembly behavior of PEG-PLA-PEG triblock copolymers in aqueous solution. *Nanoscale* **5**, 9010–9017 (2013).
82. Huh, K. M., Bae, Y. H. Synthesis and characterization of poly (ethylene glycol)/poly (l-lactic acid) alternating multiblock copolymers. *Polymer* . **40**, 6147–6155 (1999).
83. Bae, Y. H., Huh, K. M., Kim, Y., Park, K. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications. *J. Control. Release* **64**, 3–13 (2000).

84. Petrova, T., Manolova, N., Rashkov, I., Li, S., Vert, M. Synthesis and characterization of poly(oxyethylene)-poly(caprolactone) multiblock copolymers. *Polym. Int.* **45**, 419–426 (1998).
85. Dubois, P., Rutot, D., Duquesne, E., Ydens, I., Dege, P. Aliphatic polyester-based biodegradable materials : new amphiphilic graft copolymers. *Polym. Degrad. Stab.* **73**, 561–566 (2001).
86. Gu, C., Le, V., Lang, M., Liu, J. Preparation of polysaccharide derivates chitosan-graft-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **116**, 745–750 (2014).
87. Lao, S.-B., Zhang, Z.-X., Xu, H.-H., Jiang, G.-B. Novel amphiphilic chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone. *Carbohydr. Polym.* **82**, 1136–1142 (2010).
88. Rinaudo, M. New amphiphilic grafted copolymers based on polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1338–1344 (2011).
89. Zhang, P., Cao, M. Preparation of a novel organo-soluble chitosan grafted polycaprolactone copolymer for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 21–27 (2014).
90. Liu, L., Shi, A., Guo, S., Fang, Y., Chen, S., Li, J. Preparation of chitosan-g-poly lactide graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA. *React. Funct. Polym.* **70**, 301–305 (2010).
91. Feng, C. Li, Y., Yang, D., Hu, J., Zhang, X., Huang, X. Well-defined graft copolymers: from controlled synthesis to multipurpose applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1282–1295 (2011).
92. Bury, K., Neugebauer, D. Novel self-assembly graft copolymers as carriers for anti-inflammatory drug delivery. *Int. J. Pharm.* **460**, 150–157 (2014).
93. Rieger, J., Bernaerts, K. V, Prez, F. E., Je, R. Lactone end-capped poly(ethylene oxide) as a new building block for biomaterials. *Macromolecules* **37**, 9738–9745 (2004).
94. Mecerreyes, D., Atthoff, B., Boduch, K. A., Trollsas, M., Hedrick, J. L. Unimolecular combination of an atom transfer radical polymerization initiator and a lactone monomer as a route to new graft copolymers. *Macromolecules* **32**, 5175–5182 (1999).
95. Lutz, P. J., Peruch, F. in *Polym. Sci. Compr. Ref.* **6**, 511–542 (Elsevier B.V., 2012).
96. Mespouille, L., Degée, P., Dubois, P. Amphiphilic poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate)-g-poly(ϵ -caprolactone) graft copolymers: synthesis and characterisation. *Eur. Polym. J.* **41**, 1187–1195 (2005).
97. Kiehl, J., Delaite, C., Bistac, S., Schuller, A. S., Farge, H. Synthesis of graft copolymers of poly(methacrylic acid)-g-poly(epsilon-caprolactone) by coupling ROP and RAFT polymerizations. *Polymer* **53**, 694–700 (2012).
98. Khoee, S., Rahmatolahzadeh, R. Synthesis and characterization of pH-responsive and folated nanoparticles based on self-assembled brush-like PLGA/PEG/AEMA copolymer with targeted

- cancer therapy properties: A comprehensive kinetic study. *Eur. J. Med. Chem.* **50**, 416–427 (2012).
99. Chiu, H.-C., Chern, C.-S., Lee, C.-K., Chang, H.-F. Synthesis and characterization of amphiphilic poly(ethylene glycol) graft copolymers and their potential application as drug carriers. *Polymer* . **39**, 1609–1616 (1998).
 100. Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 237–280 (2012).
 101. Mecerreyes, D. Humes, J., Miller, R.D., Hedrick, J.L., Detrembleur, C., Lecomte, P., Je, R. First example of an unsymmetrical difunctional monomer polymerizable by two living / controlled methods. *Macromol. Rapid Commun.* **784**, 779–784 (2000).
 102. Mecerreyes, D., Miller, R. D., Hedrick, J. L., Detrembleur, C., Jerome, R. Ring-opening polymerization of 6-hydroxynon-8-enoic acid lactone: Novel biodegradable copolymers containing allyl pendent groups. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **38**, 870–875 (2000).
 103. Jerome, C., Lecomte, P., Riva, R. Combination of ring-opening polymerization and “click chemistry”: toward functionalization and grafting of poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules* **40**, 796–803 (2007).
 104. Habnoui, S. El, Darcos, V., Coudane, J. Synthesis and ring opening polymerization of a new functional lactone, α -Iodo- ϵ -caprolactone: A novel route to functionalized aliphatic polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 165–169 (2009).
 105. Trollsås, M. Lee, V.Y., Mecerreyes, D., Lösenhielm, P., Möller, M., Miller, R.D., Hedrick, J.L.. Hydrophilic aliphatic polyesters: design, synthesis, and ring-opening polymerization of functional cyclic esters. *Macromolecules* **33**, 4619–4627 (2000).
 106. Tian, D., Dubois, P., Je, R. Macromolecular engineering of polylactones and polylactides . isopropoxide. *Macromolecules* **9297**, 2575–2581 (1997).
 107. Tian, D., Dubois, P., Grandfils, C., Je, R. Ring-opening polymerization of polyesters bearing functional pendent groups. *Macromolecules* **9297**, 406–409 (1997).
 108. Kimura, Y., Shirotani, K., Yamane, H., Kitao, T. Ring-opening polymerization of 3(S)-[(Benzyloxycarbonyl)methyl]-1,4-dioxane-2,5-dione : A new route to a poly(alpha-hydroxy acid) with pendant carboxyl groups. *Macromolecules* **20**, 3338–3340 (1988).
 109. Dove, A. P., Pounder, R. J. Towards poly(ester) nanoparticles: recent advances in the synthesis of functional poly(ester)s by ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* **1**, 260–271 (2010).
 110. Saulnier, B., Ponsart, S., Coudane, J., Garreau, H., Vert, M. Lactic acid-based functionalized polymers via copolymerization and chemical modification. *Macromol. Biosci.* **4**, 232–237 (2004).
 111. Yu, Y. Zou, J., Yu, L., Ji, W., Law, W-C., Cheng, C. Functional polylactide-g-paclitaxel-g-poly(ethylene glycol) by azide - alkyne click chemistry. *Macromolecules* **44**, 4793–4800 (2011).

112. Jiang, X., Vogel, E. B., Smith, M. R., Baker, G. L. "Clickable" polyglycolides: Tunable synthons for thermoresponsive, degradable polymers. *Macromolecules* **41**, 1937–1944 (2008).
113. Lecomte, P. Riva, R., Schmeits, S., Rieger, J., Van Butsele, K., Jérôme, C., Jérôme, R. New prospects for the grafting of functional groups onto aliphatic polyesters. ring-opening polymerization of α - or γ -substituted ϵ -caprolactone followed by chemical derivatization of the substituents. *Macromol. Symp.* **240**, 157–165 (2006).
114. Lecomte, P., Riva, R., Jérôme, C., Jérôme, R. Macromolecular engineering of biodegradable polyesters by ring-opening polymerization and "Click" chemistry. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 982–997 (2008).
115. Pan, J., Wang, Y., Qin, S., Zhang, B., Luo, Y. Grafting reaction of poly(D,L)lactic acid with maleic anhydride and hexanediamine to introduce more reactive groups in its bulk. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **74**, 476–480 (2005).
116. Muenprasat, D., Suttireungwong, S., Tongpin, C. Functionalization of poly (lactic acid) with maleic anhydride for biomedical application. *J. Met. Mater. Miner.* **20**, 189–192 (2010).
117. Nottelet, B., Darcos, V., Coudane, J. Polyiodized-PCL as multisite transfer agent : towards an enlarged library of degradable graft copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 5006–5016 (2009).
118. Ponsart, S., Coudane, J., Vert, M. A novel route to poly(epsilon-caprolactone)-based copolymers via anionic derivatization. *Biomacromolecules* **1**, 275–281 (2000).
119. Gimenez, S., Ponsart, S., Coudane, J., Vert, M. Synthesis, properties and in vitro degradation of carboxyl-bearing PCL. *J. Bioact. Compat. Polym.* **16**, 32–46 (2001).
120. John, J., Tang, J., Bhattacharya, M. Grafting of oxazoline functional group to polycaprolactone. *J. Appl. Polym. Sci.* **67**, 1947–1955 (1997).
121. Mani, R., Bhattacharya, M., Tang, J. Functionalization of polyesters with maleic anhydride. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **37**, 1693–1702 (1998).
122. John, J., Tang, J., Yang, Z., Bhattacharya, M. Synthesis and characterization of anhydride-functional polycaprolactone. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **35**, 1139–1148 (1997).
123. Beuille, E., Darcos, V., Coudane, J., Lacroix-Desmazes, P., Nottelet, B. Regioselective halogenation of poly(lactide) by free-radical process. *Macromol. React. Eng.* **8**, 141–148 (2014).
124. Riva, R. Lussis, P., Lenoir, S., Jérôme, C., Jérôme, R., Lecomte, P.. Contribution of "click chemistry" to the synthesis of antimicrobial aliphatic copolyester. *Polymer* . **49**, 2023–2028 (2008).
125. Ponsart, S., Coudane, J., McGrath, J., Vert, M. Study of the grafting of bromoacetylated alpha-hydroxy-omega-methoxypoly(ethylene glycol) onto anionically activated poly(epsilon-caprolactone). *J. Bioact. Compat. Polym.* **17**, 417–432 (2002).

126. Coudane, J., Laurent, E., Vert, M. Poly(E-caprolactone)-based organogels and hydrogels with poly(ethylene glycol) cross-linkings. *Macromol. Rapid Commun.* **25**, 1865–1869 (2004).
127. Pan, J. Zhao, M., Liu, Yi., Wang, B., Mi, L., Yang, L. Development of a new poly(ethylene glycol)-graft-poly(D,L-lactic acid) as potential drug carriers. *J. Biomed. Mater. Res. A* **89**, 160–167 (2009).
128. Pan, J. Wang, B., Jiang, W.M., Yan, H., Zhang, X.X., Yang, L., Deng, L.H., Singh, G.K. Novel PEG-graft-PLA nanoparticles with the potential for encapsulation and controlled release of hydrophobic and hydrophilic medications in aqueous medium. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1443–1451 (2011).
129. Rostovtsev, V. V, Green, L. G., Fokin, V. V, Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 2596 (2002).
130. Meldal, M. Polymer “clicking” by CuAAC reactions. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 1016–1051 (2008).
131. Liang, L. Y., Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2933–2945 (2011).
132. Riva, R. Schmeits, S., Stoffelbach, F., Jérôme, C., Jérôme, R., Lecomte, P. Combination of ring-opening polymerization and “click” chemistry towards functionalization of aliphatic polyesters. *Chem. Commun.* 5334–5336 (2005).
133. Parrish, B., Breitenkamp, R. B., Emrick, T. PEG-and peptide-grafted aliphatic polyesters by Click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7404–7410 (2005).
134. Freichels, H., Pourcelle, V., Le Duff, C. S., Marchand-Brynaert, J., Jérôme, C. “Clip” and “click” chemistries combination: toward easy PEGylation of degradable aliphatic polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 616–621 (2011).
135. Su, R. J., Yang, H. W., Leu, Y. L., Hua, M. Y., Lee, R. S. Synthesis and characterization of amphiphilic functional polyesters by ring-opening polymerization and click reaction. *React. Funct. Polym.* **72**, 36–44 (2012).
136. Darcos, V., El Habnoui, S., Nottelet, B., El Ghzaoui, A., Coudane, J. Well-defined PCL-graft-PDMAEMA prepared by ring-opening polymerisation and click chemistry. *Polym. Chem.* **1**, 280–282 (2010).
137. Darcos, V., Al Tabchi, H., Coudane, J. Synthesis of PCL-graft-PS by combination of ROP, ATRP, and click chemistry. *Eur. Polym. J.* **47**, 187–195 (2011).
138. Jain, J. P., Kumar, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)(3)-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 456–465 (2010).
139. Essa, S., Rabanel, J. M., Hildgen, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 96–106 (2010).

140. Iatridi, Z., Tsitsilianis, C. Water-soluble stimuli responsive star-shaped segmented macromolecules. *Polymers (Basel)*. **3**, 1911–1933 (2011).
141. Hadjichristidis, N., Pispas, S., Floudas, G. *Block copolymers. Synth. Strateg. Phys. Prop. Appl.* **419** (2003).
142. Blencowe, A., Tan, J. F., Goh, T. K., Qiao, G. G. Core cross-linked star polymers via controlled radical polymerisation. *Polymer*. **50**, 5–32 (2009).
143. Lapienis, G. Star-shaped polymers having PEO arms. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 852–892 (2009).
144. Li, Y., Kissel, T. Synthesis, characteristics and in vitro degradation of star-block copolymers consisting of L-lactide, glycolide and branched multi-arm poly(ethylene oxide). *Polymer*. **39**, 4421–4427 (1998).
145. Jie, P., Venkatraman, S. S., Min, F., Freddy, B. Y. C., Huat, G. L. Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. *J. Control. Release* **110**, 20–33 (2005).
146. Lu, C. Liu, L., Guo, S.R., Zhang, Y., Li, Z., Gu, J. Micellization and gelation of aqueous solutions of star-shaped PEG–PCL block copolymers consisting of branched 4-arm poly(ethylene glycol) and polycaprolactone blocks. *Eur. Polym. J.* **43**, 1857–1865 (2007).
147. Nabid, M. R. Tabatabaei Rezaei, S.J., Sedghi, R., Niknejad, H., Entezami, A.A, Oskooie, H.A, Heravi, M.M. Self-assembled micelles of well-defined pentaerythritol-centered amphiphilic A4B8 star-block copolymers based on PCL and PEG for hydrophobic drug delivery. *Polymer*. **52**, 2799–2809 (2011).
148. Deng, G., Zhang, L., Liu, C., He, L., Chen, Y. Synthesis of miktoarm star (block) polymers based on a heterofunctional initiator via combination of ROP, ATRP and functional group transformation. *Eur. Polym. J.* **41**, 1177–1186 (2005).
149. Deng, G., Ma, D., Xu, Z. Synthesis of ABC-type miktoarm star polymers by “click” chemistry, ATRP and ROP. *Eur. Polym. J.* **43**, 1179–1187 (2007).
150. Ozlem, S. Iskin, B., Yilmaz, G., Kukut, M., Hacaloglu, J., Yagci, Y. Synthesis and pyrolysis of ABC type miktoarm star copolymers with polystyrene, poly(lactic acid) and poly(ethylene glycol) arms. *Eur. Polym. J.* **48**, 1755–1767 (2012).
151. Petrova, S., Riva, R., Jérôme, C., Lecomte, P., Mateva, R. Controlled synthesis of AB2 amphiphilic triarm star-shaped block copolymers by ring-opening polymerization. *Eur. Polym. J.* **45**, 3442–3450 (2009).
152. Qian, X. Long, L., Shi, Z., Liu, C., Qiu, M., Sheng, J., Pu, P., Yuan, X., Ren, Y., Kang, C. Star-branched amphiphilic PLA-b-PDMAEMA copolymers for co-delivery of miR-21 inhibitor and doxorubicin to treat glioma. *Biomaterials* **35**, 2322–2335 (2014).
153. Gorrasi, G., Stanzione, M., Izzo, L. Synthesis and characterization of novel star-like PEO–PMMA based copolymers. *React. Funct. Polym.* **71**, 23–29 (2011).

154. Jones, R. G. Ober, C.K., Hodge, P., Kratochvíl, P., Moad, G., Vert, M.. Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **85**, 463–492 (2012).
155. Webber, S. E. Polymer micelles : an example of self-assembling polymers. *J. Phys. Chem. B* **5647**, 2618–2626 (1998).
156. Kohane, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 203–209 (2007).
157. Letchford, K., Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 259–269 (2007).
158. Attwood, D., Booth, C., Yeates, S. G., Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S. Block copolymers for drug solubilisation: relative hydrophobicities of polyether and polyester micelle-core-forming blocks. *Int. J. Pharm.* **345**, 35–41 (2007).
159. Riess, G. Micellization of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.* **28**, 1107–1170 (2003).
160. Holmberg, K., Bo, J., Kronberg, B. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 1–527 (Jonh Wiley & sons, 2002).
161. McBain, J. W., Laing, E. M., Titley, A. F. Colloidal electrolytes : soap solutions as a type. *J. Chem. Soc.* **115**, 1279 (1919).
162. Darling, S. B. Directing the self-assembly of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 1152–1204 (2007).
163. Krafft, F. Ueber eine Theorie der colloïdalen Lösungen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **29**, 1334 (1896).
164. Hamley, I. W. *Block copolymers in solution*. (Wiley, 2005).
165. Tu, R. S., Tirrell, M. Bottom-up design of biomimetic assemblies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1537–1563 (2004).
166. Davies, J. in *Gas/Liquid Liq. interfaces* 426–438 (1957).
167. Griffin, W. C. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 249–256 (1954).
168. Elsbahy, M., Wooley, K. L. Strategies toward well-defined polymer nanoparticles inspired by nature: Chemistry versus versatility. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **50**, 1869–1880 (2012).
169. Mondon, K., Gurny, R., Möller, M. Colloidal drug delivery systems -recent advances with polymeric micelles. *Chim. Int. J. Chem.* **9**, 832–840 (2008).
170. Yang, L., El Ghzaoui, A., Li, S. In vitro degradation behavior of poly(lactide)-poly(ethylene glycol) block copolymer micelles in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **400**, 96–103 (2010).

171. Riley, T. Govender, T., Stolnik, S., Xiong, C.D., Garnett, M.C., Illum, L., Davis, S.S. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **16**, 147–159 (1999).
172. Peters, R. J. R. W. Marguet, M., Marais, S., Fraaije, M. W., van Hest, J. C. M., Lecommandoux, S. Cascade reactions in multicompartimentalized polymersomes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 146–150 (2014).
173. Marguet, M., Edembe, L., Lecommandoux, S. Polymersomes in polymersomes: multiple loading and permeability control. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 1173–1176 (2012).
174. Liu, G.-Y., Chen, C.-J., Ji, J. Biocompatible and biodegradable polymersomes as delivery vehicles in biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 8811 (2012).
175. Thevenot, J. de Oliveira, H., Sandre, O., Pourtau, L., Andrés, E., Miraux, S., Thiaudière, E., Berra, E., Lecommandoux, S. Multifunctional polymersomes for cancer theranostics. *J. Control. Release* **172**, e44–e45 (2013).
176. Levine, D. H. Ghoroghchian, P. P., Freudenberg, J., Zhang, G., Therien, M. J., Greene, M. I., Hammer, D., Murali, R.. Polymersomes: a new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy. *Methods* **46**, 25–32 (2008).
177. Bader, R. A., Putnam, D. A. *Engineering Polymer Systems for improved drug delivery*. (Wiley, 2014).
178. Beijia, M., Salvayre, R., Lauth-de Viguerie, N., Marty, J.-D. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends Biotechnol.* **30**, 485–496 (2012).
179. Hayward, R. C., Utada, A. S., Dan, N., Weitz, D. a. Dewetting instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions. *Langmuir* **22**, 4457–4461 (2006).
180. Marguet, M., Sandre, O., Lecommandoux, S. Polymersomes in “gelly” polymersomes: toward structural cell mimicry. *Langmuir* **28**, 2035–2043 (2012).
181. Sanson, C. Schatz, C., Le Meins, J.-F., Brûlet, A., Soum, A., Lecommandoux, S.. Biocompatible and biodegradable poly(trimethylene carbonate)-b-poly(L-glutamic acid) polymersomes: size control and stability. *Langmuir* **26**, 2751–2760 (2010).
182. Du, Z., Xu, J., Fan, Z. Micellar morphologies of poly (caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) block copolymers in water with a crystalline core. *Macromolecules* **40**, 7633–7637 (2007).
183. Zhang, L., He, Y., Ma, G., Song, C., Sun, H. Paclitaxel-loaded polymeric micelles based on poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) triblock copolymers: in vitro and in vivo evaluation. *Nanomedicine* **8**, 925–934 (2012).
184. Jie, P., Venkatraman, S. S., Min, F., Freddy, B. Y. C., Huat, G. L. Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. *J. Control. Release* **110**, 20–33 (2005).

185. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **385**, 113–142 (2010).
186. Rao, J. P., Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 887–913 (2011).
187. Kim, S. Y., Lee, Y. M., Baik, D. J., Kang, J. S. Toxic characteristics of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) nanospheres; in vitro and in vivo studies in the normal mice. *Biomaterials* **24**, 55–63 (2003).
188. Rösler, A, Vandermeulen, G. W., Klok, H. a. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 95–108 (2001).
189. Nemiche, N. Synthèse et Caractérisation de Copolymères Amphiphiles à Blocs. (2013).
190. Chu, B. Structure and dynamics of block copolymer colloids. *Langmuir* **11**, 414–421 (1996).
191. Pioge, S. Elaboration de systèmes nanostructurés par auto-association de copolymères à blocs amphiphiles à base de poly(oxyde d'éthylène) et de poly(acrylate d'éthyle). (2009).
192. Mc Intyre, D., Gornick, F., *Light scattering from dilute polymer solutions*. (Gordon and Breach Science Publishers, 1964).
193. Zimm, B. H. The scattering of light and radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **16**, 1093 (1948).
194. Burchard, W. Dynamic Light Scattering Method of Polymer Solutions. *Macromol. Symp.* **113**, 103–113 (1996).
195. Hamley, I. W., Castelletto, V. *Small-angle scattering of block copolymers*. *Prog. Polym. Sci.* **29**, 909–948 (2004).
196. Ballauff, M. SAXS and SANS studies of polymer colloids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**, 132–139 (2001).
197. Kausch, H. K., Heymans, N., Plummer, C. J., Decroly, P. in *Matériaux polymères propriétés mécaniques Phys.* 89–118
198. Nadeau, V., Hildgen, P. AFM study of a new carrier based on PLA and salen copolymers for gene therapy. *Molecules* **10**, 105–113 (2005).
199. Hildgen, P., Essa, S., Rabanel, J. M. Effect of aqueous solubility of grafted moiety on the physicochemical properties of poly(D,L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **388**, 263–273 (2010).
200. Benhamou, M. Introduction à la physique des polymères. (2004).
201. Mysels, E. K., Mysels, K. J. Conductimetric determination of the critical micelle concentration of surfactants in salt solutions'. *J. Colloid Sci.* **20**, 315–321 (1965).

202. Bayburtstiy, F., Korenev, A., Novozhilov, Y. A. *Handbook of Polymer Research : Monomer, Oligomers, Polymers and Composites*. 215–220 (Nova science publishers, 2007).
203. Kalyanasundaram, J. K., Thomas, K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 2039–2044 (1977).
204. Gracia, C. A, Gómez-Barreiro, S., González-Pérez, A., Nimo, J., Rodríguez, J. R. Static and dynamic light-scattering studies on micellar solutions of alkyldimethylbenzylammonium chlorides. *J. Colloid Interface Sci.* **276**, 408–413 (2004).
205. Malvern. Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. 1–5 (2006).
206. Bakkour, Y., Darcos, V., Coumes, F., Li, S., Coudane, J. Brush-like amphiphilic copolymers based on polylactide and poly(ethylene glycol): Synthesis, self-assembly and evaluation as drug carrier. *Polymer* . **54**, 1746–1754 (2013).
207. Wagner, C., Riggs, W., Davis, L., Moulder, J. *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. (Perkin-Elmer corporation Physical Electronic Division, 1979).
208. Discher, B. M. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science (80-.)*. **284**, 1143–1146 (1999).
209. Discher, D. E., Eisenberg, A. Polymer vesicles. *Science (80)*. **297**, 967–973 (2002).
210. Moughton, A. O., Hillmyer, M. A., Lodge, T. P. Multicompartment block polymer micelles. *Macromolecules* **45**, 2–19 (2012).
211. Lee, E. S., Na, K., Bae, Y. H. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle. *Nano Lett.* **5**, 325–329 (2005).
212. Singh, R., Lillard, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 215–223 (2009).
213. Yang, L. Etudes des micelles biorésorbables formées par auto-assemblage des copolymères à blocs polylactide/poly(éthylène glycol) pour la délivrance contrôlée de principes actifs. 1–26 (2010).
214. Ebrahim Attia, A. B. Ong, Z. Y., Hedrick, J. L., Lee, P. P., Ee, P. L. R., Hammond, P. T., Yang, Y-Y. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16**, 182–194 (2011).
215. Acharya, S., Sahoo, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 170–183 (2011).
216. Mishra, B., Patel, B. B., Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine* **6**, 9–24 (2010).

217. Kim, S. Y., Lee, Y. M. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* **22**, 1697–1704 (2001).
218. Elsbahy, M., Perron, M.-E., Bertrand, N., Yu, G.-E., Leroux, J.-C. Solubilization of docetaxel in poly(ethylene oxide)-block-poly(butylene/styrene oxide) micelles. *Biomacromolecules* **8**, 2250–2257 (2007).
219. Liggins, R. T., Burt, H. M. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 191–202 (2002).
220. Kwon, G. S., Okano, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **21**, 107–116 (1996).
221. Gref, R. Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., Müller, Rh. “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **18**, 301–313 (2000).
222. Sharma, G., Valenta, D. T., Altman, Y., Harvey, S., Smith, J. W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **147**, 408–412 (2010).
223. Gong, C. Y. Deng, S. Y., Wu, Q. J., Xiang, M. L., Wei, X. W., Li, L., Gao, X., Wang, B. L., Sun, L., Chen, Y. S., Li, Y. C., Liu, L., Qian, Z. Y., Wei, Y. Q. Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles. *Biomaterials* **34**, 1413–1432 (2013).
224. Song, Z., Feng, R., Sun, M., Guo, C., Gao, Y., Li, L., Zhai, G.. Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *J. Colloid Interface Sci.* **354**, 116–23 (2011).
225. Jorgensen, L., Nielsen, H. M. *Delivery technologies for biopharmaceuticals: peptides, proteins, nucleic acids and vaccines*. 1–421 (WILEY, 2009).
226. Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 1147–1235 (2013).
227. Xu, W. Siddiqui, I., Nihal, M., Pilla, S., Rosenthal, K., Mukhtar, H., Gong, S. Aptamer-conjugated and doxorubicin-loaded unimolecular micelles for targeted therapy of prostate cancer. *Biomaterials* **34**, 5244–5253 (2013).
228. Goldmann, A. S., Barner, L., Kaupp, M., Vogt, A. P., Barner-Kowollik, C. Orthogonal ligation to spherical polymeric microparticles: Modular approaches for surface tailoring. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 975–984 (2012).
229. Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., Gao, J. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharm. Res.* **24**, 1029–1046 (2007).

230. Makky, A. Analyse des mécanismes de pénétration intramembranaire de porphyrines glycoconjuguées utilisables en thérapie photodynamique des cancers: modélisation des interactions spécifiques et non-spécifiques. (2011).
231. Prabakaran, M., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. A., Gong, S. Q. Folate-conjugated amphiphilic hyperbranched block copolymers based on Boltorn (R) H40, poly(L-lactide) and poly(ethylene glycol) for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* **30**, 3009–3019 (2009).
232. Park, E. K., Lee, S. B., Lee, Y. M. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* **26**, 1053–1061 (2005).
233. Park, E. K., Kim, S. Y., Lee, S. B., Lee, Y. M. Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J. Control. Release* **109**, 158–168 (2005).
234. Yoo, H. S., Park, T. G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J. Control. Release* **96**, 273–283 (2004).
235. Diou, O. Fattal, E., Delplace, V., Mackiewicz, N., Nicolas, J. Mériaux, S., Valette, J., Robic, C., Tsapis, N. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 170–177 (2014).
236. Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N., Crockart, N., Pourcelle, V., Freichels, H., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Preat, V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. *J. Control. Release* **140**, 166–173 (2009).
237. Jiang, X. Sha, X., Xin, H., Chen, L., Gao, X., Wang, X., Law, K., Gu, J., Chen, Y., Jiang, Y., Ren, X., Ren, Q., Fang, X.. Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials* **32**, 9457–9469 (2011).
238. Ouahab, A., Cheraga, N., Onoja, V., Shen, Y., Tu, J. Novel pH-sensitive charge-reversal cell penetrating peptide conjugated PEG-PLA micelles for docetaxel delivery: in vitro study. *Int. J. Pharm.* **466**, 233–245 (2014).
239. Droumaguet, B. Le, Nicolas, J., Brambilla, D., Mura, S., Maksimenko, A., Kimpe, L., Salvati, E., Zona, C., Airolidi, C., Canovi, M., Gobbi, M., Noiray, M., Nicotra, F., Scheper, W., Flores, O., Masserini, M., Andrieux, K., Couvreur, P.. Versatile and efficient targeting using a single nanoparticulate platform : application to cancer and Alzheimer ' s disease. *ACS Nano* 5866–5879 (2012).
240. Brambilla, D. Nicolas, J., Le Droumaguet, B., Andrieux, K., Marsaud, V., Couraud, P O., Couvreur, P. Design of fluorescently tagged poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for human brain endothelial cell imaging. *Chem. Commun.* **46**, 2602–2604 (2010).
241. Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J., Nowotnik, D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1625–1633 (2004).

242. Kim, S. Y., Shin, I. G., Lee, Y. M., Cho, C. S., Sung, Y. K. Methoxy poly(ethylene glycol) and epsilon-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours. *J. Control. Release* **51**, 13–22 (1998).
243. Li, Z., Tan, B. H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* (2014). DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.003
244. Luo, Y.-L., Yu, W., Xu, F., Zhang, L.-L. Novel thermo-responsive self-assembly micelles from a double brush-shaped PNIPAM-g-(PA-b-PEG-b-PA)-g-PNIPAM block copolymer with PNIPAM polymers as side chains. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **50**, 2053–2067 (2012).
245. Liu, B., Kazlauciusas, A., Guthrie, J. T., Perrier, S. One-Pot Hyperbranched Polymer Synthesis Mediated by Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization. *Macromolecules* **38**, 2131–2136 (2005).
246. Yoo, H. S., Lee, E. A., Park, T. G. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages. *J. Control. Release* **82**, 17–27 (2002).
247. Prabakaran, M., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. a, Gong, S. Amphiphilic multi-arm-block copolymer conjugated with doxorubicin via pH-sensitive hydrazone bond for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* **30**, 5757–5766 (2009).
248. Hrubý, M., Konák, C., Ulbrich, K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J. Control. Release* **103**, 137–148 (2005).
249. Buwalda, S. J. Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., Hennink, W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* **190**, 257–273 (2014).
250. Wu, X., El Ghzaoui, A., Li, S. Aggregates and hydrogels prepared by self-assembly of amphiphilic copolymers with surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **374**, 127–134 (2012).
251. Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E. J., Zhong, Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 4969–4985 (2014).

Chapitre II : Synthèse de copolymères greffés amphiphiles à base de poly(acide lactique), poly(acide glycolique) et oligo(éthylène glycol)

Introduction

Parmi les architectures de copolymères amphiphiles existantes, les copolymères greffés à base de poly(éthylène glycol) (PEG) ou d'oligo(éthylène glycol) (OEG) présentent un intérêt particulier, car même s'ils sont similaires en composition à leurs homologues linéaires, ils possèdent une structure homogène pouvant être conservée lors du processus de (bio)dégradation. De plus, l'architecture greffée permet de contrôler la densité en branches de PEG le long du squelette polyester. Enfin, de telles architectures ouvrent des possibilités de fonctionnalisation des branches hydrophiles de PEG pour conférer à l'ensemble des propriétés de ciblage par exemple.

Plusieurs équipes ont décrit le greffage de PEG sur des squelettes polyester selon différents processus. Une voie, utilisée par Rieger *et al.*, consiste à copolymériser des lactones modifiées, considérées comme des macromonomères : il s'agit de la technique « grafting through ». Ces auteurs rapportent d'ailleurs la copolymérisation de caprolactone fonctionnalisée par une chaîne de PEG avec l' ϵ -caprolactone pour obtenir le poly(éthylène glycol)-*graft*-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-*g*-PCL).¹ Cette stratégie est cependant limitée car un tel monomère est obtenu avec un rendement très faible. De plus, les chaînons de PEG non protégés peuvent interagir avec l'étain, utilisé comme catalyseur lors de la polymérisation par ouverture de cycle.

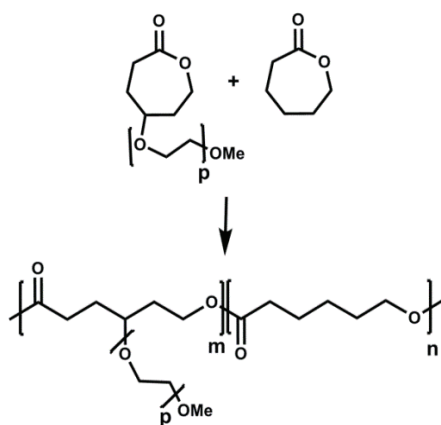


Schéma II-1 Copolymérisation de l' ϵ -caprolactone modifiée par un groupement PEG avec l' ϵ -caprolactone¹

Ainsi, un couplage post-polymérisation apparaît préférable pour fixer les branches hydrophiles, permettant également une caractérisation totale du squelette et des branches.²

Au laboratoire, des copolymères greffés de type PEG-*g*-PCL ont été obtenus après couplage des extrémités activées de PEG sur le carbone en α du carbonyle des motifs du squelette poly(ϵ -caprolactone).^{3,4}

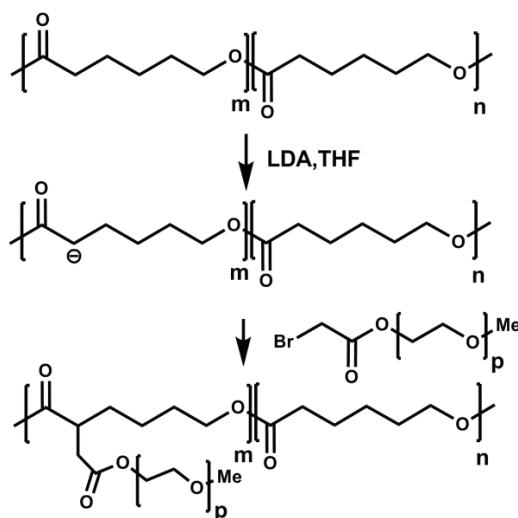


Schéma II-2 Activation anionique de la PCL et greffage de branches hydrophiles de PEG^{3,4}

Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et versatile. Cependant, l'utilisation d'une base forte non-nucléophile comme le lithium diisopropyl amide (LDA) provoque des coupures de chaînes non contrôlées.

Parrish et Emrick ont décrit le greffage de chaînons de carboxyl-PEG sur un squelette polyester dihydroxyle préformé.⁵ Le squelette polyester fonctionnel dihydroxyle, préparé au préalable par copolymérisation de α -cyclopentène- δ -valérolactone avec l' ϵ -caprolactone permet l'obtention de copolymères greffés dont la structure est bien définie avec de faibles dispersités.

Les réactions de type « clic »⁶, en particulier la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC), sont une stratégie intéressante pour la modification chimique de polyesters comme la PCL ou le PLA.⁷⁻¹⁰ Dans ce contexte, Emrick *et al.* rapportent la première synthèse de copolymères greffés PEG-*g*-PCL par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre entre des chaînes de méthoxy-PEG fonctionnalisées en extrémité de chaîne par une fonction azoture et un squelette PCL porteur de fonctions alcyne pendants.⁹ Cependant, les conditions utilisées (eau, 80°C) provoquent une dégradation prématurée du squelette comme le décrivent Riva *et al.*¹¹ D'autres méthodologies permettent d'obtenir des copolymères greffés à partir d'un squelette PCL porteur de fonctions azoture.^{10,12}

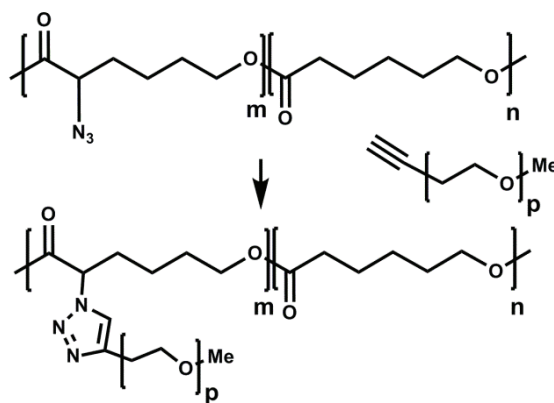


Schéma II-3 Synthèse de copolymères greffés PCL-g-PEG à partir d'un squelette PCL fonctionnalisé par des groupes azoture¹¹

Les copolymères greffés à base de PLA ou de PGA dont le squelette permet une modulation de la dégradation des systèmes sont également intéressants.¹³ Jiang *et al.* ont préparé un poly(éthylène glycol)-*graft*-poly(acide glycolique) (PEG-*g*-PGA) à partir d'un PEG fonctionnalisé azoture et un squelette poly(acide glycolique dipropargylé) sans aucune dégradation.¹⁴

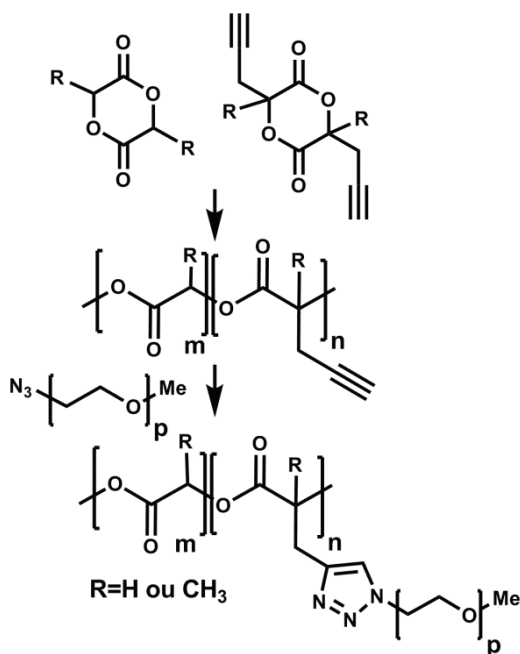


Schéma II-4 Copolymérisation d'une lactone dipropargylée avec son homologue non fonctionnalisé et couplage avec des branches de PEG azotures¹⁴

Cependant, la haute densité de fonctions alcyne pendantes le long d'un tel squelette peut mener à des réactions intramoléculaires et un encombrement stérique gênant le couplage.

Pour diminuer la densité en unités propargylées, la synthèse d'un glycolide monopropargylé et sa copolymérisation par ouverture de cycle avec du lactide est apparue une stratégie intéressante. La composition du squelette influera sur la densité de greffage et sur les propriétés de dégradation.

La technique « grafting onto » est choisie pour venir coupler les « greffons » ou branches hydrophiles. Ces greffons doivent posséder en bout de chaîne une fonctionnalisation adaptée pour permettre le greffage par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre. L'objectif de la synthèse de tels copolymères étant la conception de systèmes de délivrance de principes actifs, les propriétés physico-chimiques et la capacité d'encapsulation de principes actifs modèles hydrophobes seront étudiées.

Le contrôle du taux d'incorporation du monomère fonctionnel au sein du squelette polyester permettra de moduler le taux de greffage et influera donc sur la balance hydrophile/hydrophobe du copolymère greffé.

Simultanément à nos travaux, Wang et al ont décrit la synthèse de polyesters « cliquables » similaires présentant une distribution homogène de fonctions alcyne pendantes.¹⁵

A. Synthèse du monomère fonctionnel 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione

Le glycolide monopropargylé ou 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione a été préparé selon deux voies de synthèses (Schéma II-5). Le monomère a été obtenu soit en trois étapes (voie A), soit en quatre étapes (voie B).

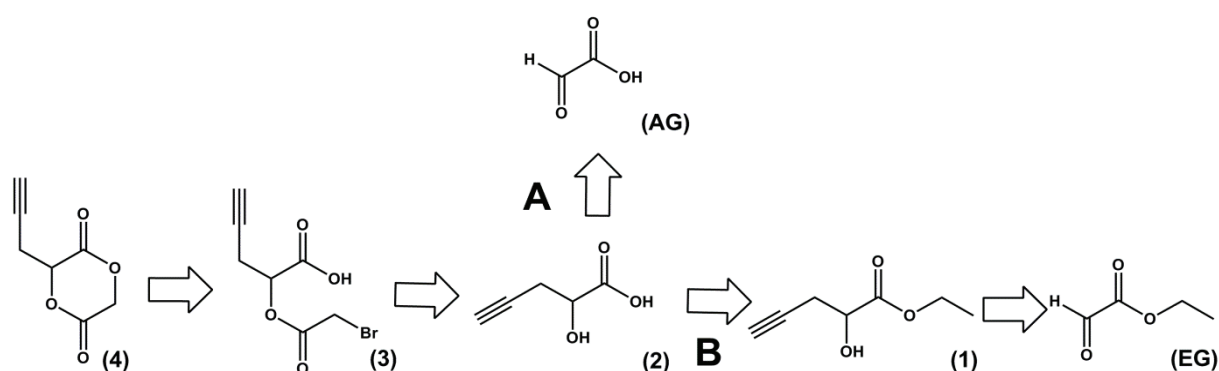


Schéma II-5 Rétrosynthèse du glycolide monopropargylé

Les deux voies de synthèse A et B diffèrent dans le choix du produit de départ. L'acide glyoxylique sera utilisé pour la voie A et l'éthyl glyoxalate pour la voie B. L'objectif est d'obtenir l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque (2) avec le meilleur rendement possible.

1. Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

a. Protocole A

L'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque (2) est préparé par une méthode proche de celle décrite par Wada *et al.*¹⁶ Différents aldéhydes sont allylés avec des systèmes à base de magnésium et du trichlorure de bismuth (BiCl_3).

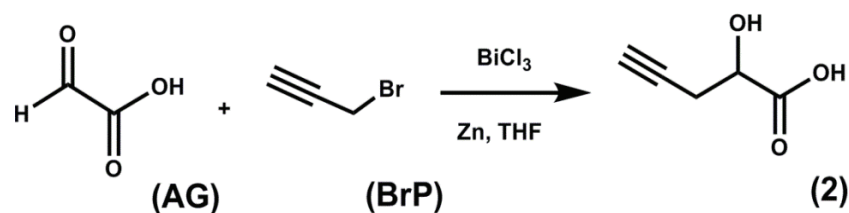


Schéma II-6 synthèse de l'acide 2-hydroxy 4-pentynoïque

Cette synthèse est une réaction de Barbier qui met en présence l'acide glyoxylique monohydraté (AG), du zinc (Zn), du trichlorure de bismuth (BiCl_3) et le bromure de propargyle (BrP). La réaction de Barbier-Grignard, employant le trichlorure de bismuth, est plus connue pour les allylations d'acides α halogénés que pour des propargylations. Cependant, aucune étude n'a montré que la propargylation ne fonctionnait pas. Le protocole a alors été adapté en essayant de remplacer un allyle par le bromure de propargyle. Plusieurs paramètres ont été étudiés, comme les températures d'addition des différents réactifs, l'ordre d'ajout des réactifs, la nature des solvants et la présence de trichlorure de bismuth sur l'efficacité de la réaction afin de déterminer les conditions optimales de la réaction.

Tableau II-1 Influence des paramètres sur la voie A

Synthèses	Ordre d'ajout des réactifs			Solvant	Température	Rendement
					°C	%
Essai 1.1	AG	BiCl_3	BrP	THF	TA	5
Essai 1.2	AG	BiCl_3	BrP	THF	0	27
Essai 2	AG	BiCl_3	BrP	THF+Eau	0	21
Essai 3.1	AG	/	BrP	THF	0	8
Essai 3.2	BrP	BiCl_3	AG	THF	0	30

D'après les résultats indiqués dans le Tableau II-1, les conditions optimales parmi celles qui ont été testées requièrent la présence de BiCl_3 avec une température de 0°C pour l'addition des réactifs dans le tétrahydrofurane (THF) et un ordre d'addition des réactifs commençant par le bromure de propargyle.

En effet, en l'absence de BiCl_3 le rendement diminue. Ensuite, l'addition à 0°C semble favoriser la formation du produit parallèlement à une activation du bromure de propargyle en présence de zinc. Le protocole de traitement et de purification du produit de la réaction ainsi ajusté permet de passer d'un rendement de 5% à 30% en obtenant le composé intermédiaire (2) sous la forme de cristaux.

La réaction a lieu selon les conditions listées dans l'essai 3.2 (Tableau II-1). Au bout de 16 heures de réaction à température ambiante, de l'acide chlorhydrique 1N est ajouté pour stopper la réaction. Cet ajout permet de régénérer le complexe à base de zinc et de brome et de les séparer du produit final. Le produit est recristallisé après traitement dans du dichlorométhane et sublimé. Il est caractérisé par analyse RMN ^1H dans l'acétone déutérée (Figure II-1) et FT-IR (Figure II-2).

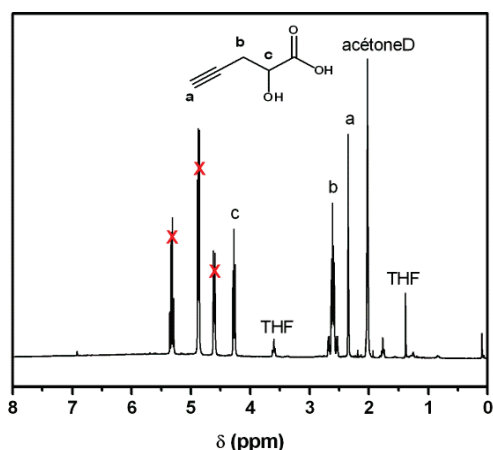


Figure II-1 Spectre RMN ^1H de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

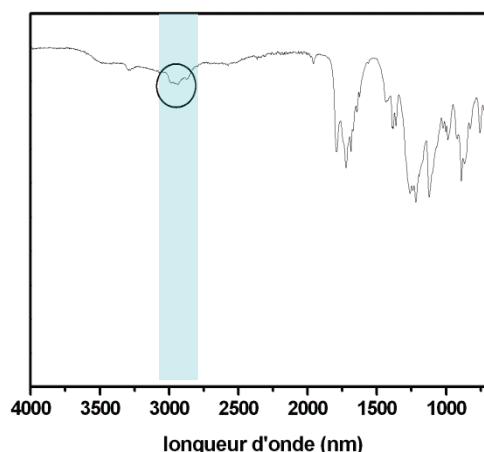


Figure II-2 Spectre FT-IR de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

La structure du composé (2) est confirmée par les signaux à δ 2,4, 2,6 et 4,2 ppm notés a, b et c correspondant respectivement au proton de la triple liaison, aux deux protons en β du carbonyle et le proton en α du carbonyle. D'autres signaux correspondant à des impuretés sont également observés. Ces impuretés se sont révélées difficiles à éliminer, même après sublimation.

En parallèle, le protocole B, nécessitant une étape supplémentaire, a été étudié.

b. Protocole B

La synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque (2) est décrite en deux étapes par Jiang *et al.*¹⁴

i. Synthèse de l'éthyl -2-hydroxy-4-pentynoate (1)

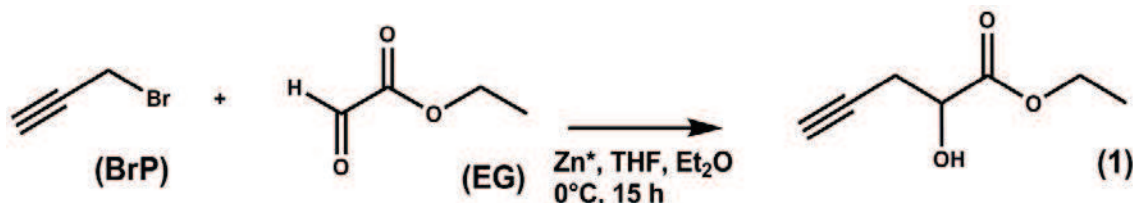


Schéma II-7 Synthèse de l'éthyl -2-hydroxy-4-pentynoate ; protocole B

La première étape ici est une réaction de Réformatsky qui a lieu grâce à la formation d'un organo-zincique en présence de zinc activé dans le but d'obtenir un α -hydroxy ester. Ce zinc (Zn^*) est activé par le même protocole que précédemment.

Le composé (1) est obtenu après addition d'acide chlorhydrique pour cliver la liaison avec le complexe composé de zinc et de brome.

Cette réaction hautement exothermique ne fournit pas sélectivement le produit (1). Il est nécessaire de réaliser une purification sur colonne de silice (*conditions* : acétate d'éthyle/heptane ; 30/70) suivi d'une distillation sous pression réduite. Le produit (1), le 2-hydroxy-4-pentynoate d'éthyle est obtenu sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 50%. Le produit a été caractérisé par spectroscopies RMN 1H (Figure II-3) et FT-IR (Figure II-4).

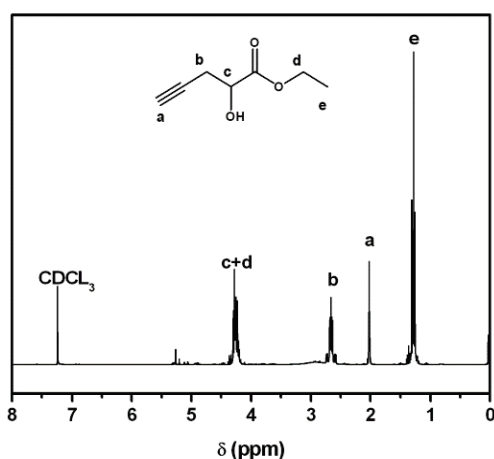


Figure II-3 Spectre RMN 1H de l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate d'éthyle

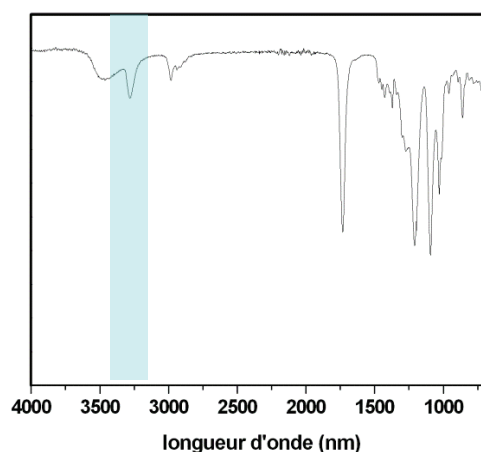


Figure II-4 Spectre FT-IR de l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate d'éthyle

Le spectre RMN 1H révèle la présence du proton de la triple liaison à δ 2 ppm en parallèle des signaux à δ 4,2 et 1,2 ppm correspondant aux protons du côté ester. A δ 2,7 ppm, le multiplet observé est assigné aux deux protons en β de la fonction ester. Son aspect particulier est lié à son environnement

puisqu'il voit le proton C-H en α de la fonction ester, et le proton de la triple liaison. L'analyse FT-IR permet de confirmer la présence de la fonction propargyle avec la bande caractéristique de la triple liaison à 3250 cm^{-1} et la bande à 1750 cm^{-1} caractéristique du groupe carbonyle d'une fonction ester.

ii. Synthèse de l'acide-2-hydroxy-4-pentynoïque (2)

L'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque est obtenu par hydrolyse. La réaction est réalisée en milieu aqueux, à reflux, pendant 72 heures pour former la fonction acide carboxylique.

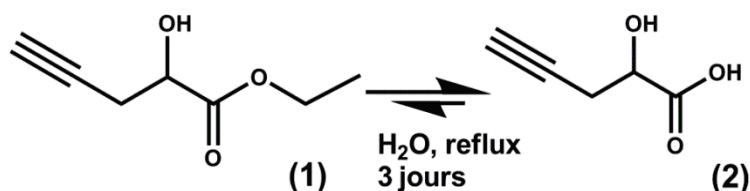


Schéma II-8 Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque ; protocole B

Le produit est purifié par extractions successives, recristallisation dans le dichlorométhane et sublimation. Le produit (2), l'acide-2-hydroxy-4-pentynoïque, est obtenu avec un rendement de 80%. Il est caractérisé par RMN ^1H (Figure II-5) et FT-IR (Figure II-6). On retrouve le signal à δ 2,05 ppm correspondant au proton de la triple liaison, le triplet à δ 4,4 ppm correspondant au proton en α du carbonyle et enfin le multiplet correspondant aux deux protons en β du carbonyle à δ 2,75 ppm.

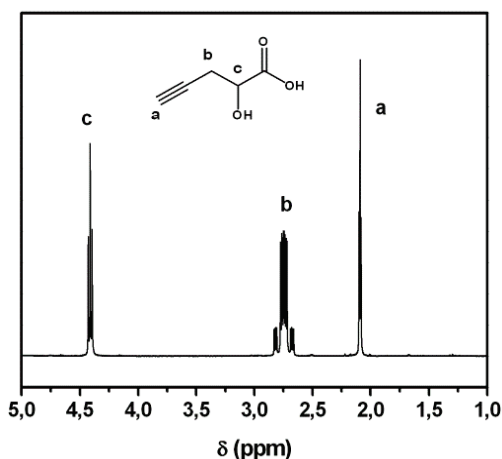


Figure II-5 Spectre RMN ^1H de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

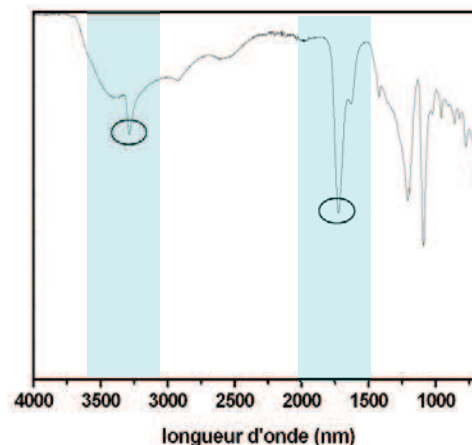


Figure II-6 Spectre FT-IR de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

L'analyse infrarouge confirme la structure non seulement par la présence de la bande de la triple liaison à 3100 cm^{-1} , mais également par le léger décalage de la bande du groupe carbonyle appartenant à la fonction acide carboxylique.

Bien que le protocole B comporte une étape supplémentaire par rapport au protocole A, il permet d'obtenir un rendement global d'environ 40% contre 30% pour le protocole A. De plus, le composé 2 obtenu est pur. Le protocole B a donc été choisi.

2. Synthèse de l'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque

L'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque a été préparé par une méthode de bromo-acétylation adaptée de la littérature.¹⁷

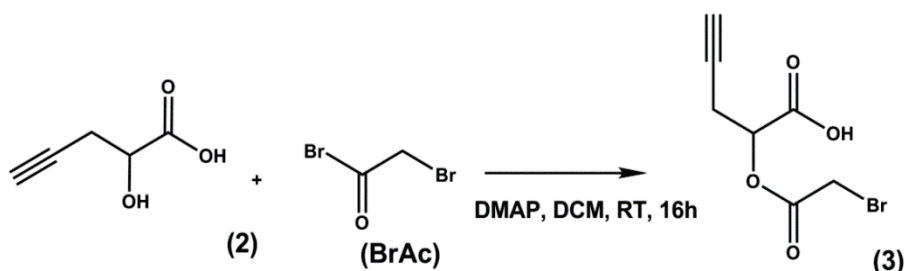


Schéma II-9 Synthèse de l'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque

Le composé (3), l'acide 2-(2-bromoacétoxy)-4-pentynoïque est purifié par lavage et utilisé tel quel pour l'étape suivante, avec un rendement de 90%.

Le spectre RMN ^1H du composé (3) est présenté Figure II-7. Le proton caractéristique de la triple liaison est retrouvé à δ 2 ppm. Le proton en α du carbonyl voit son signal déblindé en raison de son changement d'environnement. En effet, on observe un déplacement de δ 4,5 à 5,3 ppm, puisqu'il était en α d'un alcool dans le composé (2) alors qu'il est maintenant en α d'une fonction ester. Le signal correspondant aux deux protons du segment bromoacétylé fait son apparition sur le spectre à une valeur de δ 4 ppm sous l'apparence d'un singulet.

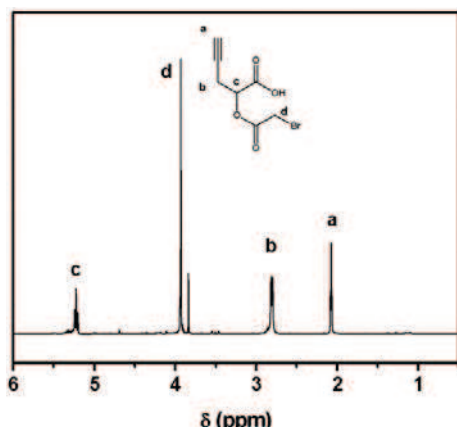


Figure II-7 Spectre RMN ^1H de 2(2-bromoacétoxy)-4-pentynoate d'éthyle

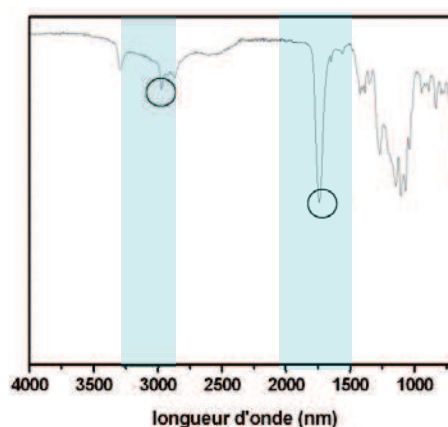


Figure II-8 Spectre FT-IR de 2(2-bromoacétoxy)-4-pentynoate d'éthyle

Par l'intermédiaire de l'analyse FT-IR (Figure II-8), la nouvelle structure est confirmée par l'apparition d'un signal intense à 1697cm^{-1} correspondant à la fonction ester maintenant présente. La bande à 3100 cm^{-1} , correspondant à la triple liaison est également présente.

3. Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione

La dernière étape consiste en une réaction de cyclisation intramoléculaire catalysée par une base, le carbonate de sodium. Cette dernière doit avoir lieu dans un milieu dilué (30 mmol.L^{-1}) pour favoriser la cyclisation intramoléculaire.

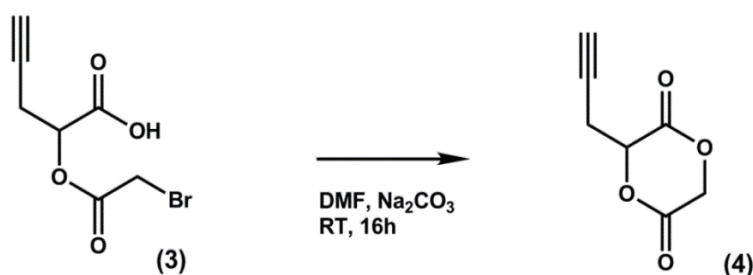


Schéma II-10 Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione

La réaction a lieu pendant une nuit à température ambiante dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF) sec. Après évaporation du DMF et précipitation des sels, le milieu réactionnel est extrait à l'éther. Le produit pur (4), la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione ou glycolide monopropargylé, est obtenu après recristallisation dans du chloroforme sous forme de cristaux légèrement jaunes avec un rendement moyen de 40%. Le produit a été caractérisé par RMN ^1H (Figure II-9). Ainsi, on trouve toujours à δ 2 ppm le signal caractéristique du proton de la triple liaison. A δ 2,9 et 5,6 ppm, les mêmes signaux que précédemment sont observés pour les protons en α et β du groupe carbonyle. Les signaux présents sous la forme d'un doublet dédoublé sont attribués aux deux protons γ de la molécule car ils sont diastéréotopiques, i.e n'ont pas le même environnement et ne sont pas équivalents. La présence de ces signaux et la disparition du singulet à δ 4 ppm sont la preuve de la cyclisation intramoléculaire et donc de la formation du glycolide monopropargylé.

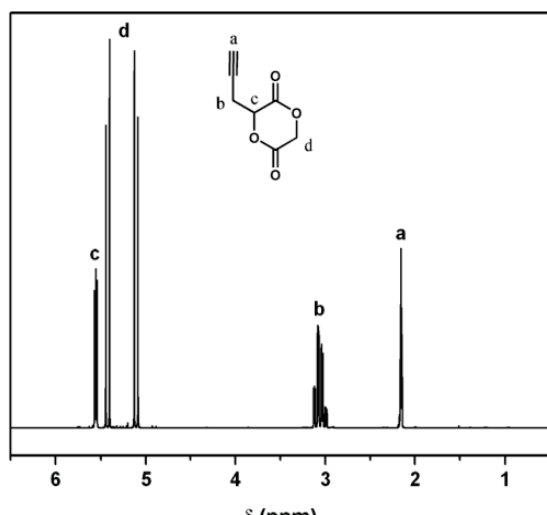


Figure II-9 Spectre RMN ^1H de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione

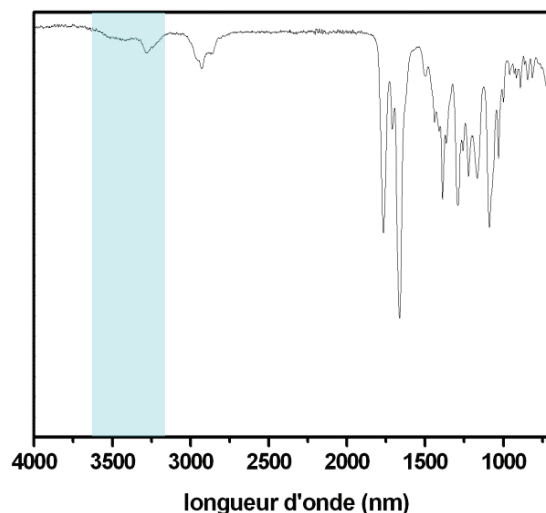


Figure II-10 Spectre FT-IR de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione

L'analyse infrarouge (Figure II-10) a confirmé la présence du groupe propargyle (pic caractéristique à 3264 cm^{-1}) et la présence de deux groupes carbonyle de type ester. En spectroscopie de masse, la présence du pic de l'ion moléculaire (M^+) à $m/z=173,0$ nous fournit une preuve supplémentaire de la structure chimique de la dilactone fonctionnelle.

Au vu du rendement de cette étape (40%), il semble que des réactions intermoléculaires aient lieu résultant de l'attaque de l'oxygène de la fonction acide carboxylique activée sur le CH_2 d'une autre molécule et non sur elle-même. La formation d'oligomères rend difficile l'extraction et la purification de notre monomère.

Ainsi, le monomère glycolide propargylé est obtenu en quatre étapes avec un rendement global de l'ordre de 15%. Ce rendement est en accord avec les données de la littérature pour ce type de monomère fonctionnel.^{14,18}

B. Copolymérisation par ouverture de cycle du glycolide propargylé du L-lactide

Les polymérisations par ouverture de cycle (ROP) ont été réalisées avec deux systèmes catalytiques différents : l'octoate d'étain ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) et la *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP).

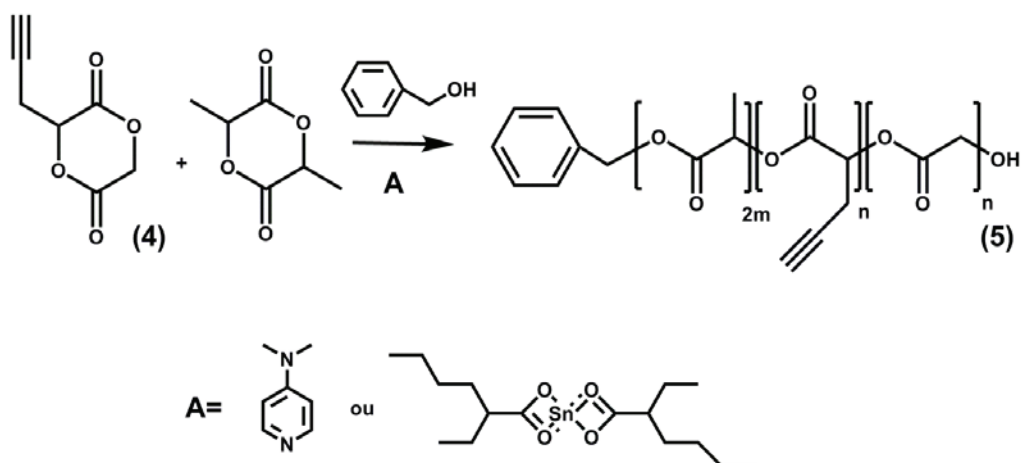


Schéma II-11 Copolymérisation du L-lactide et du glycolide propargylé

Concernant la notation du copolymère, le glycolide monopropargylé (4) sera défini comme l'association d'un motif acide glycolique (GA) et d'un motif acide glycolique propargylé (PGA). Le L-lactide sera défini comme l'association de deux motifs acides lactiques (LA). La proportion en unités PGA et en unités GA seront notées respectivement x et y , et la proportion en unités LA sera notée z . Le copolymère sera donc noté $\text{P(PGA}_x\text{-co-GA}_y\text{-co-LA}_z\text{)}$.

1. Copolymérisation avec l'octoate d'étain

Les premiers essais de polymérisation par ouverture de cycle ont été réalisés avec l'octoate d'étain. C'est le catalyseur utilisé en routine au laboratoire. Comme précisé précédemment, il est le catalyseur le plus utilisé pour la synthèse de polyesters car il est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA).

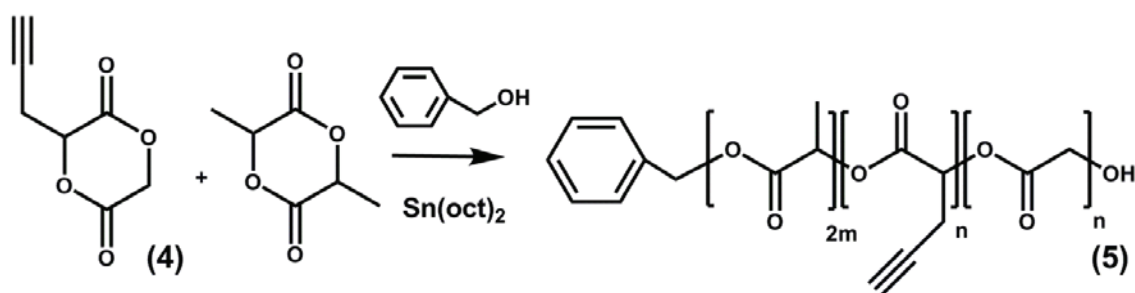


Schéma II-12 Copolymérisation avec l'octoate d'étain

a. Copolymérisations en solution

La copolymérisation a été réalisée en solution dans le toluène à 80°C (Tableau II-2). Différents ratios de glycolide monopropargylé par rapport au lactide ont été visés. Les copolymères ont été caractérisés par RMN ^1H , GPC et MALDI-TOF.

Tableau II-2 Caractéristiques des copolymères P(PGA-co-GA-co-LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en solution avec l'octoate d'étain

	Copolymères ^a	[4] _o /[LA] _o	$F_{PGA,th}^b$ %	Conv ^c %	$F_{PGA,exp}^d$ %	$M_{n,th}^e$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^f$ g.mol ⁻¹	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	D_M
5-1	P(PGA _{11,5} -co-GA _{11,5} -co-LA ₇₇)	5/15	12,5	88	11.5	2600	2200	2000	1,2
5-2	P(PGA ₁₈ -co-GA ₁₈ -co-LA ₆₄)	10/10	25	80	18	2500	2400	1500	1,2
5-3	P(PGA ₃₈ -co-GA ₃₈ -co-LA ₂₄)	15/5	37,5	71	38	2300	2800	1400	1,1
5-4	P(PGA ₂₂ -co-GA ₂₂ -co-LA ₅₆)	35/35	25	51	22	4100	3500	2500	1,3
5-5	P(PGA ₂₃ -co-GA ₂₃ -co-LA ₅₄)	35/35	25	55	23	5600	3400	2800	1,5

^a Conditions de copolymérisations : T=80°C ; toluène

5-1 à 5-3 [BnOH]:[Sn(oct)₂] = 1 : 0.1 et [4]+[LA]:[BnOH]=20 : 1 ;

5-4 [BnOH]:[Sn(oct)₂] = 1 : 0.1 et [4]+[LA]:[BnOH]=70 : 1 ;

5-5 [BnOH]:[Sn(oct)₂] = 1 : 0.5 et [4]+[LA]:[BnOH]=70 : 1 ;

^b calculé selon l'équation 2.3 ; ^c déterminé par RMN ¹H ; ^d calculé selon l'équation 2.1 ; ^e calculé selon l'équation 2.4 ; ^f calculé selon l'équation 2.2

Rappel de notation P(PGA_x-co-GA_y-co-LA_z)

- x représente le pourcentage d'unités acide glycolique propargylé,
- y (égal à x) représente le pourcentage d'unités acide glycolique
- z représente le pourcentage d'unités acide lactique.

L'analyse des spectres RMN ¹H des copolyesters fonctionnels est délicate en raison de la superposition des signaux (Figure II-11). Cependant, tous les massifs présents ont pu être attribués aux protons du squelette polyester.

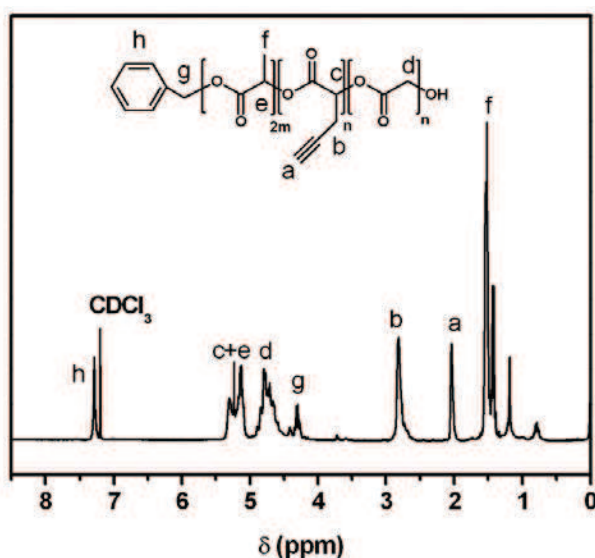


Figure II-11 Spectre RMN ¹H typique d'un copolyester fonctionnel P(LA-co-GA-co-PGA) obtenu par polymérisation par ouverture de cycle avec l'octoate d'étain

Les protons correspondant au groupement benzyle se retrouvent à δ 7,2 ppm. Le signal à δ 2 ppm est lui, caractéristique du proton de la triple liaison, témoin de la bonne incorporation du monomère dans le squelette. Les signaux à δ 1,5 et 5,2 ppm sont attribués aux protons des motifs LA. Le proton c du motif acide glycolique propargylé se trouve superposé au signal du proton e du motif acide lactique car ils ont un environnement équivalent. Le signal correspondant aux protons du motif acide glycolique est retrouvé à δ 4,7 ppm sous la forme d'un multiplet tandis que les protons CH_{2b} seront présents sous la forme d'un multiplet aux alentours de δ 2,7 ppm.

A partir des données de la RMN ¹H (Figure II-12), les équations 2.1 et 2.2 sont établies :

$$F_{PGA,exp} = \frac{I_a}{\frac{1}{3}I_f + I_a + \frac{1}{2}I_d} \times 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$M_{n,RMN} = \frac{I_a \times 154 + \frac{1}{6} I_f \times 144}{\frac{1}{5} I_h} \quad \text{Eq. 2.2}$$

L'équation 2.1 permet d'accéder au taux d'incorporation en motif PGA, ou fraction molaire expérimentale $F_{PGA,exp}$, en faisant un rapport des intensités relatives des signaux correspondant aux protons de la triple liaison sur la somme des intensités relatives des protons rattachés à tous les autres motifs à savoir PGA, LA et GA. L'équation 2.2 permet de calculer la masse molaire expérimentale, $M_{n,RMN}$, en utilisant les intensités relatives des signaux correspondant aux deux unités monomères et au groupement benzyle de bout de chaîne.

Les équations 2.3 et 2.4 permettant de déterminer les masses molaires théoriques, $M_{n,th}$ et la fraction molaire théorique en unités propargylées, $F_{PGA,th}$ sont définies ci-dessous.

$$F_{PGA,th} = \frac{[PGA]_0}{[PGA]_0 + [GA]_0 + [LA]_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$M_{n,th} = \frac{[4]_0 \times 154 + [LA]_0 \times 144}{[BnOH]_0} \times \text{conv} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Une bonne corrélation entre la fraction molaire expérimentale $F_{PGA,exp}$ (équation 2.1) et la fraction molaire théorique $F_{PGA,th}$ (équation 2.3) est observée (Tableau II-2). Des copolyesters avec une incorporation allant de 11% à 38% (copolymères 5-1 à 5-3) ont pu être synthétisés. De même, il existe une correspondance entre la masse molaire théorique (équation 2.4) et la masse molaire expérimentale calculée par RMN 1H (équation 2.2). Les estimations de masse molaire par chromatographie d'exclusion stérique (CES) dans le THF témoignent de valeurs légèrement inférieures aux valeurs attendues. Ces données ne sont pas inhabituelles puisqu'en effet, de tels résultats ont déjà été rapportés dans la littérature pour des copolyesters fonctionnels. Il est intéressant de noter que ceci est différent du poly(acide lactique) seul, dont la masse molaire est généralement surestimée par un facteur 1,5.¹⁷ Ce contraste s'explique par la différence de volumes hydrodynamiques des copolymères analysés face aux standards de polystyrène dans le THF. Les dispersités obtenues ($D_M = M_w/M_n$) sont relativement faibles.

A partir des valeurs de masses molaires calculées par RMN 1H et du calcul de la fraction molaire expérimentale en unités propargylés $F_{PGA,exp}$, il est possible de retrouver la composition en unités [GA] et [PGA] au sein du copolyester selon l'équation 2.5.

$$[PGA] = [GA] = \frac{M_{n,exp} \times 2F_{PGA,exp}}{154} \quad \text{Eq. 2.5}$$

De manière similaire, la composition en unités [LA] peut être déterminée avec l'équation 2.6

$$[LA] = \frac{M_{n,exp} \times (1 - 2F_{PGA,exp})}{144} \quad \text{Eq. 2.6}$$

Cependant, lorsque la masse molaire théorique est augmentée, une perte de contrôle est constatée avec un taux de conversion plafonnant à 55%. L'augmentation de quantité de catalyseur (0,5 équivalent) n'a eu aucun effet.

b. Copolymérisations en masse

Dans le but d'obtenir des polyesters de plus haute masse molaire, des essais de polymérisation par ouverture de cycle en masse à 110°C ont été réalisés. Une bonne incorporation du motif glycolide propargylé et des masses plus élevées ont été observées (Tableau II-3). Les dispersités D_M comprises entre 1,5 et 2 sont des valeurs classiques pour des polymérisations en masse. Des masses molaires inférieures à 7000 g.mol⁻¹ ont été obtenues et lorsque des masses molaires de 15000 g.mol⁻¹ (copolymère 5-7) ont été visées, le taux de conversion n'a pas dépassé 70 %.

Des essais à 140 °C ont alors été réalisés avec des temps de réaction allant de 1 à 4 heures. Il a été montré qu'il était possible de préparer la PCL propargylée par polymérisation par ouverture de cycle en masse à 130 °C avec une bonne incorporation en unité monomère propargylée.⁷ Une dégradation des copolymères a été observée ici. Des conditions similaires sont néanmoins décrites dans la littérature. Jiang *et al.* décrit par exemple la copolymérisation d'un lactide dipropargylé utilisant l'octoate d'étain à 130°C.¹⁴ Finalement les meilleurs résultats de polymérisation par ouverture de cycle en masse ont été réalisés à 110°C (Tableau II-3).

Tableau II-3 Caractéristiques des copolymères P(PGA-co-GA-co-LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en masse avec l'octoate d'étain

	Copolymères ^a	[4] ₀ /[LA] ₀	$F_{PGA,th}^b$ %	Conv ^c %	$F_{PGA,exp}^d$ %	$M_{n,th}^e$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^f$ g.mol ⁻¹	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	PDI
5-6	P(PGA ₂₂ -co-GA ₂₂ -co-LA ₅₆)	25/25	25	68	22	4600	6500	4500	1,7
5-7	P(PGA ₁₇ -co-GA ₁₇ -co-LA ₆₆)	50/50	25	61	17	10200	6400	3700	1,6

^a Conditions de copolymérisations : T=110°C

5-6 [BnOH]:[Sn(oct)₂] = 1 :0.1 et [4]+[LA]:[BnOH]=50 :1

5-7 [BnOH]:[Sn(oct)₂] = 1 :0.1 et [4]+[LA]:[BnOH]=100 :1

^b calculé selon l'équation 2.3 ; ^c déterminé par RMN ¹H ; ^d calculé selon l'équation 2.1 ; ^e calculé selon l'équation 2.4 ; ^f calculé selon l'équation 2.2

Rappel des équations

$$F_{PGA,exp} = \frac{I_a}{1/3 I_f + I_a + 1/2 I_d} \times 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$M_{n,RMN} = \frac{I_a \times 154 + 1/6 I_f \times 144}{1/5 I_h} \quad \text{Eq. 2.2}$$

$$F_{PGA,th} = \frac{[PGA]_0}{[PGA]_0 + [GA]_0 + [LA]_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$M_{n,th} = \frac{[4]_0 \times 154 + [LA]_0 \times 144}{[BnOH]_0} \times \text{conv} \quad \text{Eq. 2.4}$$

L'objectif suivant a été de synthétiser des copolyesters fonctionnels en utilisant des conditions plus douces pour mieux contrôler le processus. Le système catalytique a été modifié pour utiliser la catalyse organique.

2. Copolymérisations avec la *N,N*-diméthylaminopyridine

Une série de copolymères à base de glycolide monopropargylé a été préparée par polymérisation par ouverture de cycle en utilisant un catalyseur organique. Un organocatalyseur de la famille des pyridines dialkylamines, comme la *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) a été utilisé. Bien que certains métaux comme l'octoate d'étain soient approuvés par la FDA, l'organocatalyse apparaît de plus en plus comme une alternative plus « écologique » à l'utilisation des métaux de transition (cf chapitre 1), mais également plus « compatible » avec une application biomédicale.^{19,20} Yu *et al.* ont récemment décrit la copolymérisation d'un lactide monopropargylé avec un co-monomère lactide en utilisant un catalyseur organique, la DMAP.²¹

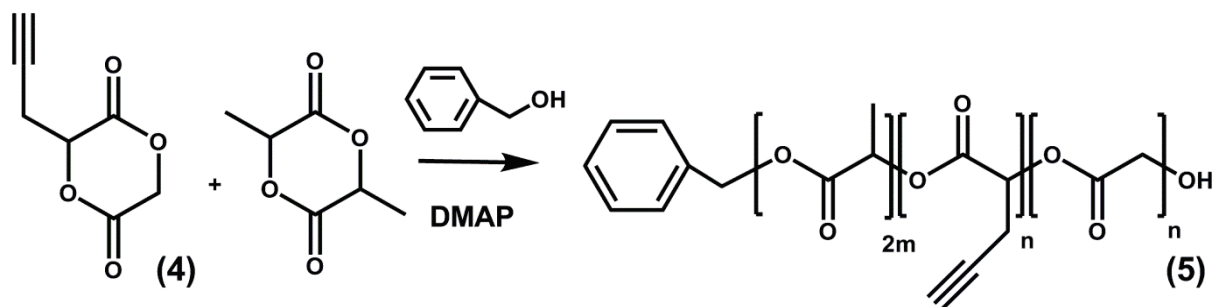


Schéma II-13 Copolymérisation avec la DMAP

Des copolymères ont été synthétisés en présence de DMAP comme catalyseur et d'alcool benzylique comme amorceur, dans le dichlorométhane à 30°C pendant 17 heures. La quantité de DMAP a été modulée en fonction de la masse molaire visée. Si on compare à l'octoate d'étain, des quantités plus importantes de DMAP sont utilisées. De manière synthétique, pour des rapports [M]/[I] (éq. Monomères/ amorceur) inférieurs à 50, un nombre d'équivalents de DMAP autour de 2,5 a été utilisé. Au-delà d'un [M]/[I] de 50, les quantités de DMAP ont été doublées.²² La DMAP a été éliminée par simple précipitation dans le méthanol.

Rappel des équations

$$F_{PGA,exp} = \frac{I_a}{1/3 I_f + I_a + 1/2 I_d} \times 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$M_{n,RMN} = \frac{I_a \times 154 + 1/6 I_f \times 144}{1/5 I_h} \quad \text{Eq. 2.2}$$

$$F_{PGA,th} = \frac{[PGA]_0}{[PGA]_0 + [GA]_0 + [LA]_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$M_{n,th} = \frac{[4]_0 \times 154 + [LA]_0 \times 144}{[BnOH]_0} \times \text{conv} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Tableau II-4 Caractéristiques des copolymères P(PGA-co-GA-co-LA) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle en solution avec la N,N-diméthylaminopyridine

	Copolymères ^a	$[4]_0/[LA]_0$	$F_{PGA,th}^b$ %	Conv ^c %	$F_{PGA,exp}^d$ %	$M_{n,th}^e$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^f$ g.mol ⁻¹	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	D_M
5-8	P(PGA ₁₁ -co-GA ₁₁ -co-LA ₇₈)	5/15	12	75	11	2300	2100	2000	1,2
5-9	P(PGA ₂₀ -co-GA ₂₀ -co-LA ₆₀)	15/15	25	80	20	3600	3300	2100	1,4
5-10	P(PGA ₂₈ -co-GA ₂₈ -co-LA ₄₄)	22/8	37	85	28	3900	3400	2300	1,7
5-11	P(PGA ₃₆ -co-GA ₃₆ -co-LA ₂₈)	25/5	42	90	36	4100	4000	2600	1,4
5-12	P(PGA ₃₆ -co-GA ₃₆ -co-LA ₂₈)	40/10	40	90	36	6900	6500	4000	1,5

^a Conditions de copolymérisations : T=40°C ; dichlorométhane,

5-8 [BnOH]:[DMAP] = 1:2.5 et [4]+[LA]:[BnOH]=20:1

5-9 à 5-11 [BnOH]:[DMAP] = 1:2.5 et [4]+[LA]:[BnOH]=30:1

5-12 [BnOH]:[DMAP] = 1:5 et [4]+[LA]:[BnOH]=50:1

^b calculé selon l'équation 2.3 ; ^c déterminé par RMN ¹H ; ^d calculé selon l'équation 2.1 ; ^e calculé selon l'équation 2.4 ; ^f calculé selon l'équation 2.2

Les masses molaires théoriques et expérimentales et les fractions molaires théoriques et expérimentales sont déterminées comme précédemment avec les équations 2.1 à 2.4

Une bonne corrélation entre les masses molaires théoriques et les masses molaires expérimentales est observée (Tableau II-4). De même, les fractions molaires expérimentales $F_{PGA,exp}$ en unités propargylées sont proches des fractions molaires théoriques $F_{PGA,th}$. La RMN 1H du copolymère (Figure II-12) est identique à celles des copolymères préparés avec l'octoate d'étain comme catalyseur.

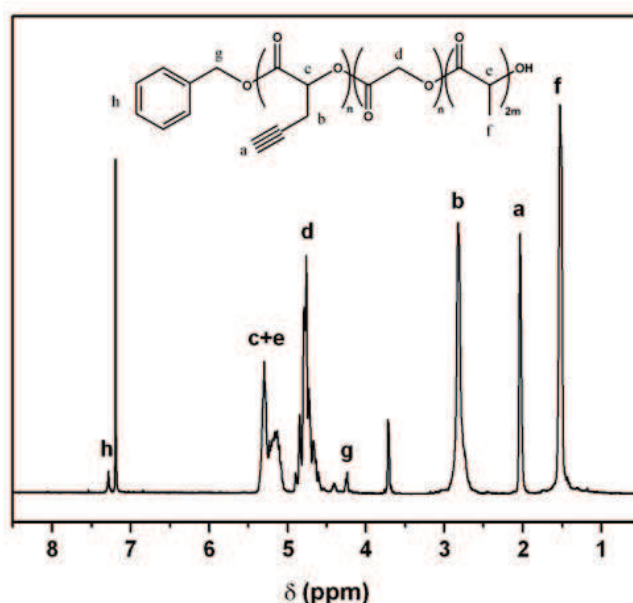


Figure II-12 Spectre RMN 1H typique d'un copolyester fonctionnel P(LA-co-GA-co-PGA) obtenu par polymérisation par ouverture de cycle avec la DMAP

La chromatographie d'exclusion stérique met en évidence une population monomodale, indiquant un bon contrôle du processus de polymérisation.

Le copolymère (5-10) a été caractérisé par spectroscopie MALDI-TOF (Figure II-13). Les pics montrent l'obtention de copolymères statistiques avec une incorporation aléatoire des différents monomères. Grâce à la précision des analyses MALDI-TOF et à la formule établie Figure II-13, il est possible de déterminer la structure et la composition du copolyester fonctionnalisé. En effet, les signaux correspondant à la polymérisation aléatoire des motifs glycolide propargylé (4) ($M = 154 \text{ g.mol}^{-1}$) et L-lactide ($M = 144 \text{ g.mol}^{-1}$) sont retrouvés et confirment la tendance statistique. En parallèle, une distribution monomodale est observée, centrée sur un pic de plus haute intensité correspondant à une masse de $m/z = 1487.3 \text{ g.mol}^{-1}$. Ce pic révèle un copolyester ionisé par du sodium avec une composition de $DP_4 = 6$ et $DP_{LA} = 3$ et un résidu d'alcool benzylique en bout de chaîne.

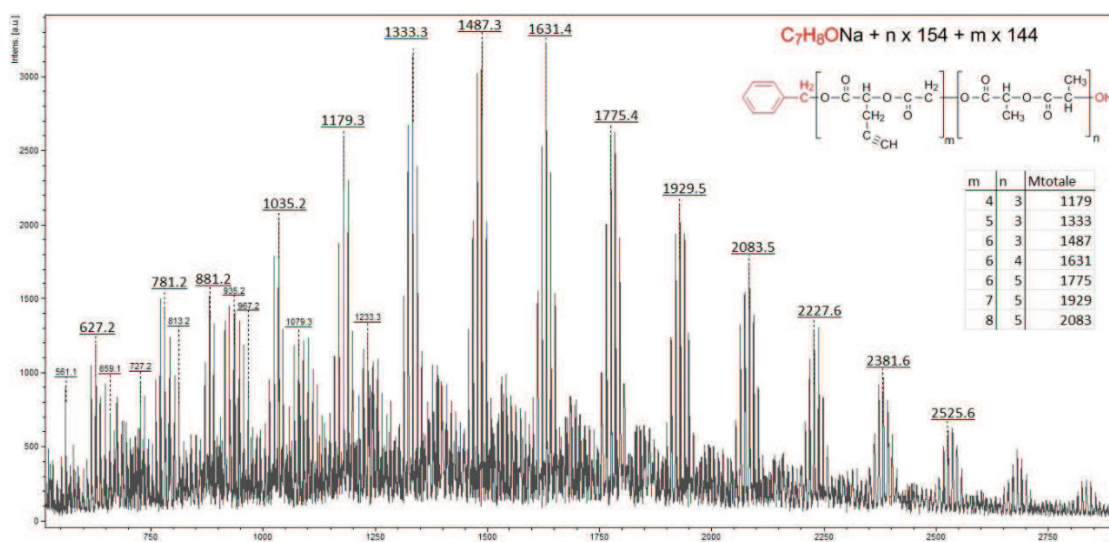


Figure II-13 Spectre MALDI du copolymère 5-10 obtenu par polymérisation par ouverture de cycle à 40°C, en présence de DMAP [BnOH]:[DMAP] = 1:2.5 et [4]:[LA]:[BnOH]=30:1

Une gamme de copolyesters fonctionnalisés par des fonctions alcyne pendantes a été synthétisée, allant de 2000 à 7000 g.mol⁻¹ avec un taux de fonctionnalisation variant de 10 à 40%.

C. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre

Comme il a été vu dans le chapitre précédent, différents copolyesters porteurs de fonctions pendantes alcyne ont été préparés. Dans un premier temps, une molécule fluorophore, l'anthracène, a été greffée au squelette par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC) pour évaluer l'efficacité de la réaction. L'anthracène présente l'avantage d'être facilement détectable que cela soit en RMN ¹H mais aussi et surtout en spectroscopie UV-Vis. L'anthracène sera facilement identifié en chromatographie d'exclusion stérique équipé d'un détecteur à barrette de diodes. Cette molécule est d'abord fonctionnalisée par un groupement azoture puis greffée par chimie « clic » à notre squelette.

Ensuite, des branches hydrophiles d'oligo(éthylène glycol) (OEG) ont été greffées sur le squelette polyester afin d'obtenir un copolymère greffé amphiphile. Le greffage a également été réalisé via la CuAAC, où les « branches » hydrophiles seront préalablement fonctionnalisées en bout de chaîne par un groupement azoture réagissent avec les fonctions alcyne du polyester.²³

L'avantage d'un tel système, utilisant le Cu(I), repose non seulement sur la régiosélectivité de la réaction permettant la formation sélective du cycle triazole 1,4 mais également sur son efficacité.²⁴

En effet, en abaissant la barrière d'énergie d'activation (E_a) nécessaire à la réaction et en fonction de la pureté du catalyseur, cette réaction peut être quantitative.

1. Synthèse de copolymères greffés avec l'anthracène

Les premiers essais de couplage, dans le but de tester l'efficacité de la réaction sur le polyester fonctionnel, ont été réalisés avec l'anthracène porteur d'une fonction azoture. La réaction de couplage entre le polyester (copolymère 5-5, $F_{PGA,exp}=22\%$) et l'anthracène azoturé est réalisé par CuAAC.

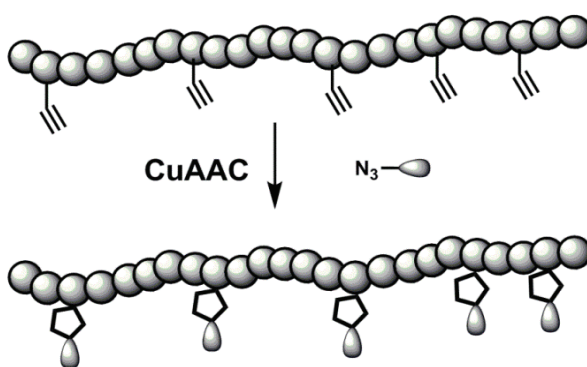


Figure II-14 Illustration de la CuAAC entre le copolyester et l'anthracène

a. Synthèse du 9-azidométhylantracène

L'anthracène, fluorophore utilisé pour de nombreuses applications, représente une alternative à l'utilisation de la coumarine.²⁵ L'obtention de l'anthracène fonctionnalisé par un groupement azoture a été réalisée en suivant une méthode décrite par Mallard *et al.*²⁶ La réaction consiste à mettre en présence le 9-chlorométhylantracène (6), l'azoture de sodium et le bromure de tétrabutylammonium dans du DMF à 80°C pendant 1 heure (Schéma II-14) pour former le 9-azidométhyl-anthracène (7).

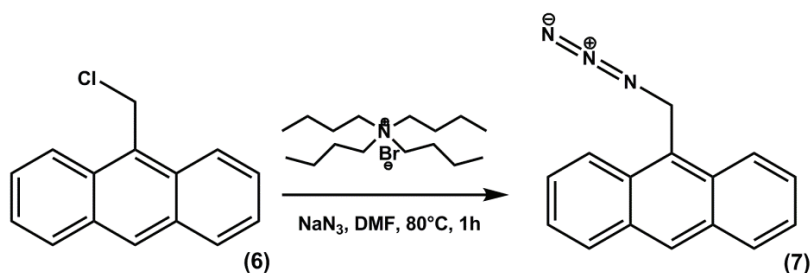


Schéma II-14 synthèse du 9-azidométhylantracène

La structure a été confirmée par FT-IR avec l'apparition à 2100cm^{-1} de la bande caractéristique de la fonction azoture (Figure II-15).

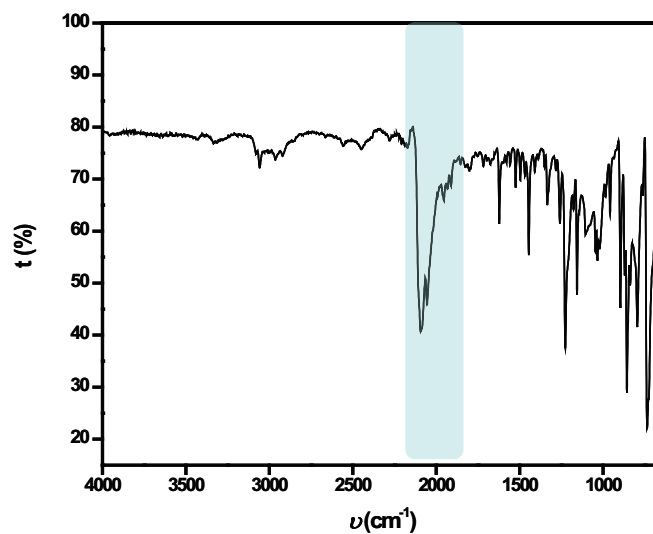


Figure II-15 Spectre FT-IR du 9-azidométhylantracène

De même, l'analyse RMN ^1H (Figure II-16) confirme la fonctionnalisation avec l'intégration à δ 5,3 ppm de deux protons e correspondant au CH_2 en α du groupement azoture.

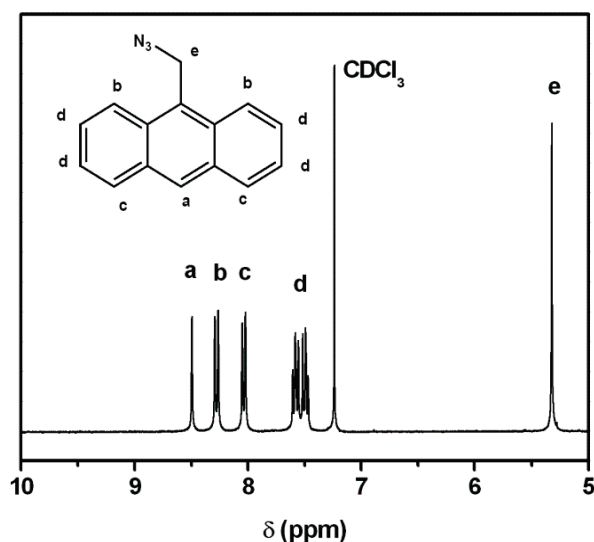


Figure II-16 Spectre RMN ^1H du 9-azidométhylantracène

b. Couplage du 9-azidométhylantracène par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre : P(PGA-co-GA-co-LA)-g-anthracène

La CuAAC entre le copolyester (5-5) et l'anthracène fonctionnalisé est réalisée dans le DMF avec un système catalytique utilisant le sulfate de cuivre (CuSO_4) et un agent réducteur, l'ascorbate de sodium (Na-asc) à température ambiante pendant 60 heures (Schéma II-15).

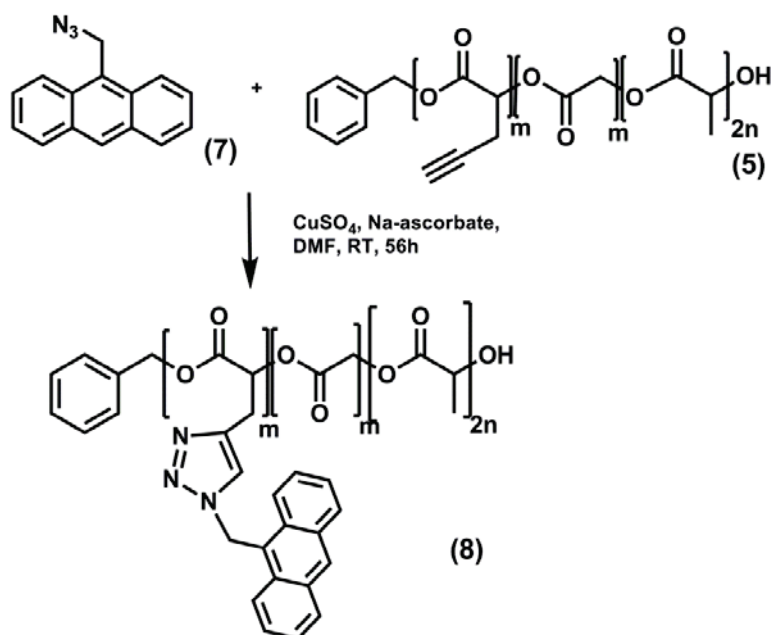


Schéma II-15 Réaction de chimie « clic » permettant le greffage de l'anthracène sur le squelette polyester

Le Cu(I) est généré *in situ* par réduction du Cu(II) (CuSO_4) grâce au Na-asc. Le changement de couleur du bleu au jaune témoigne de cette réduction. La réaction a été suivie en analysant des prélèvements du milieu réactionnel par FT-IR. La disparition de la bande intense à 2100cm^{-1} correspondant au groupement azoture prouve l'efficacité de la réaction (Figure II-17).

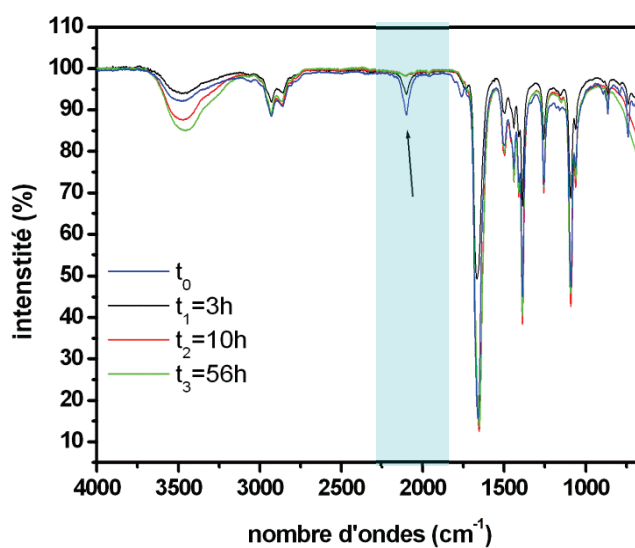


Figure II-17 Superposition des spectres infrarouges à différents temps de réaction confirmant le succès de la réaction de chimie « clic » entre le copolyester fonctionnel et l'anthracène azoturé

Après 60 heures à 40°C, le copolymère greffé est purifié par dialyse contre de l'acétone. Le produit est caractérisé par RMN ^1H , IR, CES et CES couplée avec un lecteur PDA ($\lambda=258\text{-}390\text{nm}$). L'analyse RMN ^1H fait apparaître, en plus des signaux correspondant au squelette copolyester, des signaux correspondant aux protons aromatiques de l'anthracène entre δ 8,9 et 7,3 ppm. De plus, la disparition du signal à δ 2 ppm, correspondant au proton de la triple liaison, confirme le succès de la réaction.

L'analyse infrarouge du produit purifié atteste l'absence de la bande à 2100 cm^{-1} .

L'analyse CES couplée au PDA permet de confirmer l'obtention d'un signal UV pour un temps de rétention de 18,5 min, temps de rétention avoisinant celui du copolyester avant fonctionnalisation, pour une masse molaire de $5000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Même si une quantification des groupements anthracène greffés n'est pas possible, à cause d'une superposition de pics en RMN ^1H et de signaux trop faibles, il est au moins possible d'affirmer que le greffage a eu lieu.

2. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles avec l'oligo(éthylène glycol)

Le polymère hydrophile choisi est l'oligo(éthylène glycol) (OEG). Celui-ci confèrera des propriétés amphiphiles aux copolyesters greffés. L'OEG est un polyéther biocompatible largement utilisé pour la conception de systèmes de délivrance de principes actifs (PA). Il est éliminé par filtration rénale après dégradation du polyester auquel il était relié. La masse molaire de l'OEG choisi est de $550\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

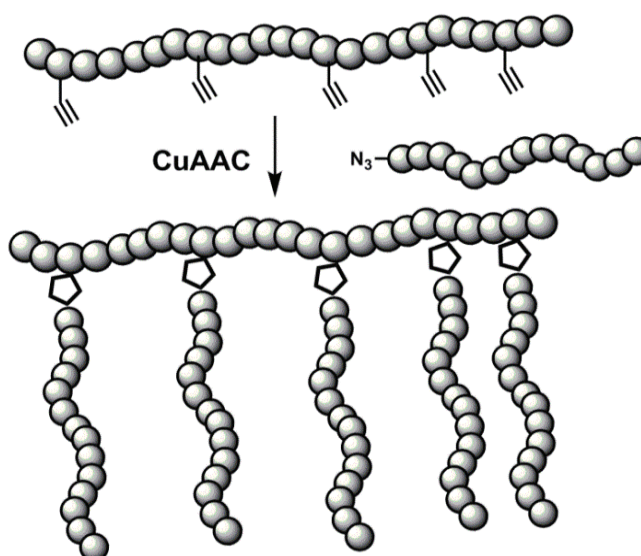


Figure II-18 Illustration de la chimie clic avec l'oligo(éthylène glycol)

a. Synthèse de l'α-azido-ω-méthoxy-oligo(éthylène glycol)

La synthèse d'oligomères d'éthylène glycol fonctionnalisés par un azoture en extrémité de chaîne est effectuée en deux étapes selon un processus adapté de la littérature (Schéma II-16).²⁷

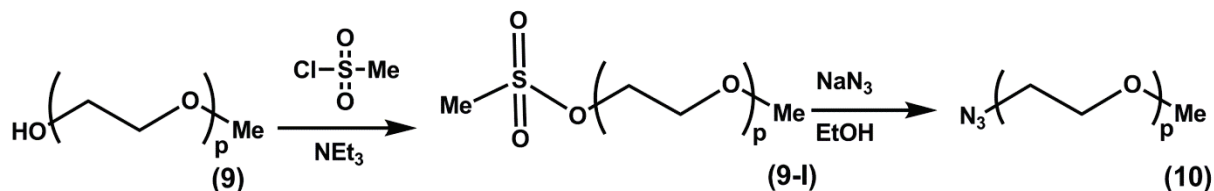


Schéma II-16 Synthèse de l' α-azido-ω-méthoxy -oligo(éthylène glycol)

Dans la première étape, la fonction hydroxyle de l'α-hydroxy-ω-méthoxy-oligo(éthylène glycol) est « activée » par le chlorure de méthane sulfonyle (MsCl). La deuxième étape sera une substitution nucléophile pour générer la fonction azoture en bout de chaîne.

La molécule intermédiaire (9-I) est utilisée pour l'étape suivante après un simple lavage. Elle est mise en présence d'azoture de sodium pendant 72 heures dans l'éthanol à reflux. Le composé (10), soit l' α-azido-ω-méthoxy-oligo (éthylène glycol) a été caractérisé par analyse RMN ¹H, FT-IR et MALDI-TOF.

L'analyse FT-IR (Figure II-19) vient confirmer la modification des extrémités de chaînes avec l'apparition d'une bande caractéristique de la fonction azoture à 2100 cm⁻¹.

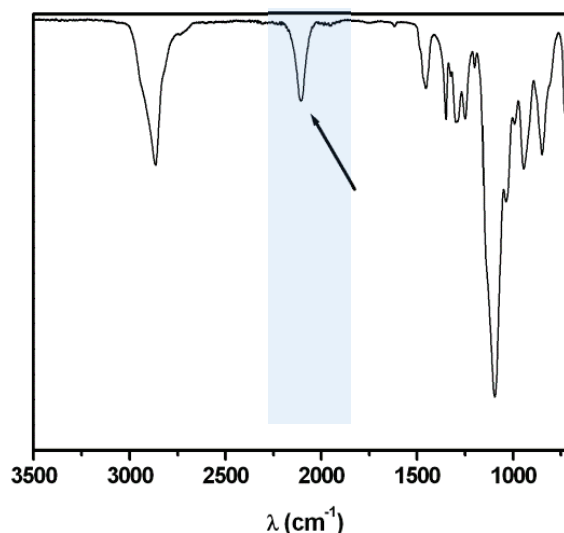


Figure II-19 Spectre infrarouge de l' α-azido-ω-méthoxy-oligo (éthylène glycol)

Le spectre RMN ¹H du composé (10) révèle le déplacement de deux triplets, ayant pour intégration deux protons chacun, qui représentent les protons méthylène en α du groupement azoture à δ 3,35 et 3,48ppm (Figure II-20).

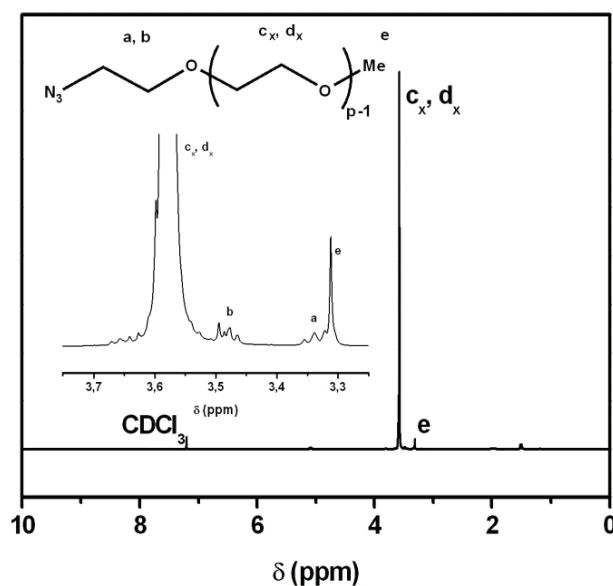


Figure II-20 Spectre RMN ^1H de l' α -azido- ω -méthoxy -oligo (éthylène glycol)

De même, l'analyse MALDI-TOF vient corroborer ces résultats avec une distribution gaussienne, où le pic de plus haute intensité, sur lequel est centrée la population, nous donne un DP de 11 (correspondant à 11 motifs éthylène glycol) pour une masse molaire de 564 g.mol^{-1} , correspondant à un polyéther en présence de sodium et dont le bout de chaîne est un groupement azoture. Le tout avec un rendement quantitatif de 96%.

b. Couplage de l' α -azido- ω -méthoxy-oligo(éthylène glycol) sur le P(PGA-co-GA-co-LA)-g-OEG

La réaction de couplage a donc lieu entre le squelette polyester fonctionnalisé par des groupements alcyne pendants et des oligomères d'oligo(éthylène glycol) fonctionnalisés en bout de chaîne par des groupements azoture. La réaction de ces deux fonctions, en présence d'un système catalytique à base de cuivre, permettra la formation d'un cycle triazole par la réaction de cycloaddition de Huisgen (Schéma II-17).

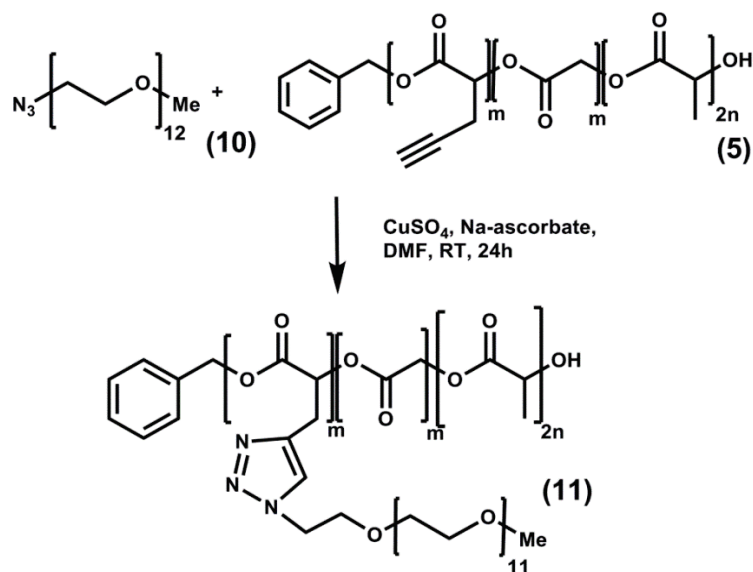


Schéma II-17 Obtention des copolymères greffés amphiphiles (11)

Plusieurs systèmes catalytiques à base de cuivre ont été testés.²⁸ Le système utilisant le sulfate de cuivre (I) en présence de Na-asc a été retenu pour les réactions de greffage. Les réactions ont lieu sous atmosphère inerte d'argon pour éviter l'oxydation secondaire du cuivre. L' α -azido- ω -méthoxy-oligo éthylène glycol est ajouté en léger excès (1,2 équivalent) de manière à « forcer » la réaction. Le sulfate de cuivre est ajouté au milieu réactionnel sous la forme d'une solution contenant Na-asc. Un changement de coloration quasi immédiat est observé, témoignant de la réduction du cuivre. Un suivi par prélèvements et mesure FT-IR permet d'évaluer l'avancement de la réaction par disparition de la bande à 2100cm^{-1} (Figure II-21).

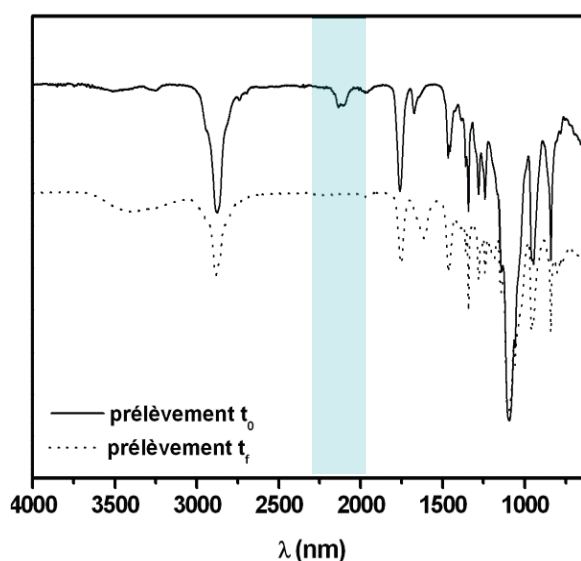


Figure II-21 Superposition des spectres infrarouge effectués à t_0 et $t_f=24\text{h}$

Après 24 heures à température ambiante. Une dialyse contre de l'eau permet d'éliminer d'une part les oligomères d'éthylène glycol qui n'auraient pas réagi et d'autre part les résidus de cuivre. Les copolymères greffés ainsi obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H , GPC and RMN DOSY. Les résultats sont indiqués dans le Tableau II-5. Les copolymères greffés sont notés ici comme $\text{P}(\text{PGA}_x\text{-co-GA}_y\text{-co-LA}_z)\text{-g-PEG500}_w$, avec x , y et z définis précédemment, et w la proportion de branches d'oligo(éthylène glycol) greffées au squelette.

Tableau II-5 Caractérisation des copolymères greffés par chimie "clic"

Copolymères	$F_{\text{PGA},\text{exp}}^b$	$F_{\text{graft},\text{exp}}^c$	Eff^d	$M_{n,\text{th}}^e$	$M_{n,\text{graft},\text{exp}}^f$	DM	B^g	f_{OEG}^h
Greffés ^a	%	%	%	g.mol^{-1}	g.mol^{-1}			%
11-1	12	7	58	3100	3200	1,2	0,8	34
11-2	20	15	75	7000	6700	1,3	1,6	49
11-3	28	26	93	9500	7250	1,2	1,9	53
11-4	36	30	83	12700	12000	1,4	3,3	67

^aConditions de couplage: $[5]:[10]:[\text{CuSO}_4]:[\text{Na-asc}] = 1:1,2:0,1:0,2$; TA, 24 heures

11-1 = $\text{P}(\text{PGA}_{12}\text{-co-GA}_{12}\text{-co-LA}_{76})\text{-graft-PEG550}_7$;

11-2 = $\text{P}(\text{PGA}_{20}\text{-co-GA}_{20}\text{-co-LA}_{60})\text{-graft-PEG550}_{15}$;

11-3 = $\text{P}(\text{PGA}_{28}\text{-co-GA}_{28}\text{-co-LA}_{44})\text{-graft-PEG550}_{26}$;

11-4 = $\text{P}(\text{PGA}_{36}\text{-co-GA}_{36}\text{-co-LA}_{28})\text{-graft-PEG550}_{30}$

^b calculé avec l'équation 2.1 ; ^c calculé avec l'équation 2.8 ; ^d calculé avec l'équation 2.9, ^e calculé avec l'équation 2.10, ^f calculé avec l'équation 2.7, ^g calculé avec l'équation 2.11, ^h calculé avec l'équation 2.12

Afin d'expliquer les résultats du Tableau II-5, il est nécessaire d'étudier les spectres RMN ^1H des copolymères greffés (Figure II-22).

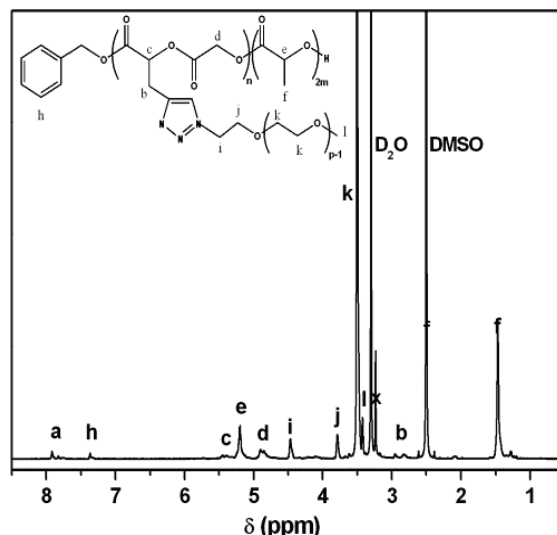


Figure II-22 Spectre RMN ^1H typique d'un copolymère greffé

Les signaux correspondant au squelette polyester sont visibles à δ 7,4 ppm, entre δ 4,8 et 5,5 ppm et à δ 1,5 ppm. A δ 7,9 ppm, un nouveau signal apparaît, attribué au proton du cycle triazole, ce qui confirme le greffage des branches oligo(éthylène glycol) sur le squelette polyester. En parallèle, le signal à δ 2 ppm du proton de la triple liaison disparaît. Le signal à δ 3,4 ppm est attribué aux protons du groupe méthoxy en bout de chaîne des branches oligo éthylène glycol. Les signaux à δ 3,8 et 4,4 ppm intégrant chacun pour deux protons, correspondent au premier motif éthylène glycol après le cycle triazole. Le pic à δ 3,51 ppm représente tous les protons méthylène des motifs éthylène de l'oligo(éthylène glycol).

L'étude de ces spectres non seulement confirme la présence du copolyester et de l'oligo(éthylène glycol) après purification, mais permet également d'établir les équations 2.7 et 2.8 grâce auxquelles on détermine les masses molaires expérimentales $M_{n,graft,exp}$ et les taux de greffage en oligo(éthylène glycol) ou fractions molaires expérimentales en oligo(éthylène glycol), $F_{graft,exp}$. L'équation 2.9 permet de déterminer un rendement de couplage expérimental Eff . Celui-ci découle du calcul de l'équation 2.8 puisqu'il est défini comme le rapport des fractions molaires expérimentales en oligo(éthylène glycol) $F_{graft,exp}$ et des fractions molaires expérimentales alcyne $F_{PGA,exp}$.

$$M_{n,graftRMN} = \frac{\frac{1}{2}I_d \times 154 + \frac{1}{6}I_f \times 144}{\frac{1}{5}I_h} + \frac{I_i}{2} \times 550 \quad \text{Eq. 2.8}$$

$$F_{graft,exp} = \frac{\frac{1}{2}I_i}{\frac{1}{6}I_f + \frac{1}{2}I_d + \frac{1}{2}I_i} \times 100 \quad \text{Eq. 2.9}$$

$$Eff = \frac{F_{graft,exp}}{F_{PGA,exp}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.10}$$

Le rendement théorique de couplage qui suppose que la totalité des fonctions alcyne a réagi, est donc égal au nombre d'unités [PGA] calculé dans les tableaux précédents. En partant de ce postulat, l'équation 2.10 permet d'estimer une masse molaire théorique.

$$M_{n,th} = [5]_0 \times M_5 + [(PGA)_0 \times 550] \times Eff \quad \text{Eq. 2.10}$$

Une formule dérivée de l'HLB, définie au préalable par Griffin et explicitée dans le chapitre 1 (eq. 1.1), est décrite par l'équation 2.11. Celle-ci nous donnera la proportion notée f_{OEG} d'oligo(éthylène glycol) par rapport à la masse molaire globale. Ainsi, en se basant sur les études antérieures (cf chapitre 1), cette f_{OEG} est non seulement un indicateur de la composition de l'architecture greffée mais également un facteur permettant de prédire son comportement en milieu aqueux. De manière similaire, l'équation 2.12 définira la balance hydrophile/hydrophobe, notée B , comme le rapport des unités/motifs hydrophiles sur les unités/motifs hydrophobes. Ces différentes valeurs permettront de comparer les copolymères entre eux.

$$f_{OEG} = \frac{M_{hydrophile}}{M_{totale}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.11}$$

$$B = \frac{[n \text{ motifs hydrophiles}]}{[m \text{ motifs hydrophobes}]} \quad \text{Eq. 2.12}$$

Dans les conditions de cette thèse, les motifs hydrophiles sont définis par les unités éthylène glycol [OE] tandis que les motifs hydrophobes sont définis par les motifs acide lactique, acide glycolique et acide glycolique propargylé.

Avec ces équations et les résultats du Tableau II-5, un rendement moyen de couplage de 70% est observé, reflétant l'efficacité de la réaction. De même, en parallèle d'une corrélation entre les masses théoriques et les masses expérimentales, il sera relevé une augmentation des masses molaires théoriques et expérimentales en adéquation avec l'augmentation du taux de greffage en branches oligo(éthylène glycol).

Des preuves supplémentaires du succès de la réaction sont observées par CES quand on superpose les chromatogrammes CES avant et après la réaction de couplage (Figure II-23). Le copolymère greffé (en pointillé) présente un décalage vers les plus hautes masses molaires en comparaison avec le copolymère (5) de départ (trait plein).

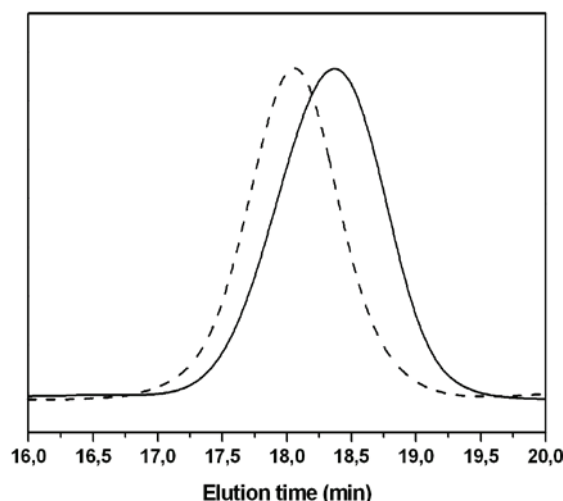


Figure II-23 CES du P(LA-co-GA-co-PGA)($M_n=3800 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1,4$, trait continu) et P(LA-co-GA-co-PGA)-g-(OEG)($M_n=6000 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1,3$, trait pointillé)

L'efficacité de couplage est également confirmée par spectroscopie RMN DOSY. La DOSY est une technique de RMN qui fait migrer les espèces présentes en solution en fonction d'un coefficient de diffusion. Ce coefficient de diffusion dépendra lui-même de plusieurs facteurs comme l'environnement, le solvant, la masse molaire, les interactions entre molécules. En cela, cette technique peut être considérée comme une analyse RMN couplée à une analyse chromatographique possédant deux dimensions. La première, notée F_1 , indique les valeurs des coefficients de diffusion (D). La deuxième dimension, notée F_2 , indique généralement les déplacements chimiques avec l'allure du spectre RMN ^1H .²⁹ Cet outil est très utile pour mettre en évidence, analyser et séparer les molécules dans des mélanges complexes. Cette technique a été utilisée pour vérifier le greffage, par dissolution de notre composé dans le diméthylsulfoxyde déutéré ($\text{DMSO}-d_6$). Après étude du spectre RMN DOSY (Figure 26), la coordonnée/dimension F_2 correspond au spectre RMN ^1H précédemment étudié avec les signaux des blocs polyester ($\delta \approx 4.8\text{-}5.5$ et 1.50 ppm) et les signaux des branches oligo(éthylène glycol) ($\delta \approx 3.51$ et 3.40 ppm). Ces signaux présentent sur la dimension F_1 une seule et unique valeur de coefficient de diffusion D : $1.00 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Ces données se traduisent expérimentalement par la présence des signaux sur une droite horizontale unique, signifiant l'appartenance de tous les protons à une même macromolécule et confirmant le succès du couplage. De plus, comme indiqué sur la Figure II-24, par comparaison avec une RMN DOSY d'un oligo(éthylène glycol) seul dans le diméthylsulfoxyde, de même masse molaire que les branches greffées au squelette, une valeur de coefficient D de $6,31 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ sera observée.

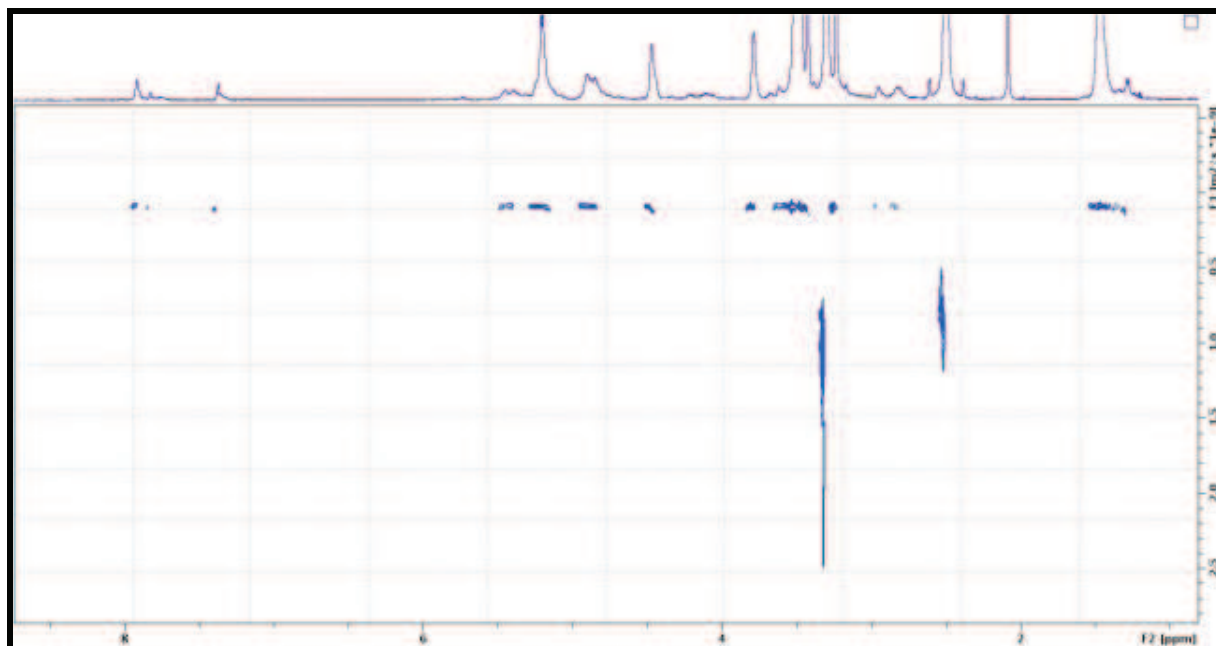


Figure II-24 Spectre RMN DOSY typique d'un copolymère greffé

Il est noté que les seules autres espèces présentant un coefficient de diffusion différent sont dus au solvant deutéré utilisé pour l'analyse RMN à savoir le DMSO- d_6 .

Par la suite, deux copolymères ont été choisis pour déterminer leurs propriétés physico-chimiques en milieu aqueux. Le choix s'est effectué en fonction de la composition et de la solubilité en milieu aqueux. Le polymère (11-1) de masse molaire plus faible, a été écarté en raison d'un problème de solubilité du copolymère en milieu aqueux. Le copolymère (11-4) a été écarté à cause de sa dégradation trop rapide. Comportant la plus haute proportion d'oligo(éthylène glycol) et d'acide glycolique propargylé sur le squelette polyester, celui-ci a présenté, après une dialyse en milieu aqueux, un tracé CES témoignant d'un phénomène de dégradation du copolymère.

D. Formation et caractérisation de nano-objets en milieu aqueux

Les propriétés physico-chimiques en milieu aqueux de deux des copolymères greffés, (11-2) et (11-3), ont été étudiées afin d'évaluer le potentiel de ces architectures pour la conception de systèmes de délivrance de PA.

Les méthodes de dissolution directe et de nanopréciipitation ont été employées pour induire l'auto-assemblage de ces copolymères sous la forme de nanoparticules de type micelle (NP). En effet, la nature amphiphile de ces copolymères devrait permettre la formation d'agrégats de type micelle en milieu aqueux avec un cœur hydrophobe constitué du squelette polyester et les branches d'oligo(éthylène glycol) constituant la couche extérieure hydrophile (Figure II-25).



Figure II-25 Morphologie attendue des auto-assemblages de copolymères greffés amphiphiles en milieu aqueux

La formation des nano-objets a d'abord été évaluée par détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC) par fluorimétrie.

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique par (CAC) par spectroscopie de fluorescence

La concentration critique d'agrégation, comme définie précédemment, est un paramètre essentiel permettant d'estimer la stabilité de nos systèmes en milieu aqueux. En effet, plus la concentration critique d'agrégation obtenue sera faible, plus les nanoparticules de type micelle seront stables. Les méthodes de préparation décrites dans le chapitre précédent sont illustrées dans la partie expérimentale. Les résultats obtenus pour les deux copolymères sont listés dans le Tableau II-6.

Tableau II-6 Détermination des CAC des copolymères greffés 11-2 et 11-3

Copolymères greffés	CAC mg.L ⁻¹	CAC _m ^a μmol.L ⁻¹	f _{OEG} ^b %	B ^c
11-2	17	2,5	49	1,6
11-3	41	5,6	53	1,9

Conditions : préparés par dissolution directe,

^a déterminé par l'équation 2-13 ; ^b déterminé par l'équation 2-11, ^c déterminé par l'équation 2-12.

Les mesures de fluorimétrie ont été effectuées en excitation. La longueur d'onde d'émission (λ_{em}) a été fixée à 394 nm. Une molécule chromophore, le pyrène, a été utilisée comme sonde fluorescente à une concentration de 6×10^{-7} mol.L⁻¹. Les spectres d'excitation du pyrène en fonction des concentrations de copolymères greffés sont présentés sur la Figure II-26. Les propriétés de fluorescence du pyrène dépendent de la polarité de son environnement. A partir d'une certaine concentration en copolymère, sa fluorescence du pyrène est modifiée car les molécules basculent d'un environnement aqueux à un environnement hydrophobe. Les intensités des pics d'excitation à λ

= 337 et 333 nm, notées respectivement I_1 et I_3 , ont été choisies car elles dépendent de la polarité du microenvironnement dans lequel le pyrène se trouve.

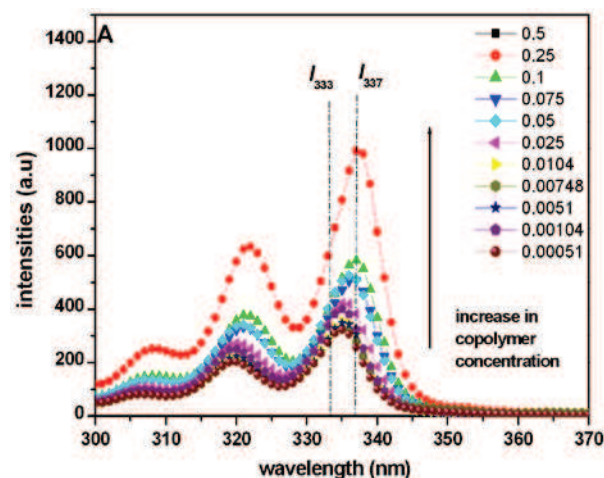


Figure II-26 Spectre d'excitation du pyrène en fonction de la concentration en copolymère

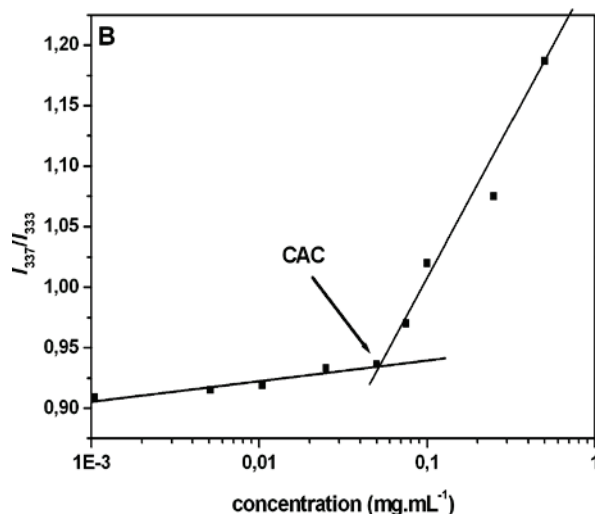


Figure II-27 Profil typique obtenu lors de la détermination de la CAC des nano-objets

La CAC a été déterminée en établissant un graphe du rapport I_1/I_3 des intensités à 337 et 333 nm, en fonction du logarithme de la concentration en copolymère (Figure II-27). En dessous d'une certaine concentration, le rapport des intensités I_1/I_3 varie de manière négligeable. En revanche, au-delà de cette concentration, la CAC, ce rapport augmente brutalement avec la formation des nano-objets et l'incorporation subséquente du pyrène dans le cœur des auto-assemblages. Ainsi, la CAC est déterminée par l'intersection des droites des deux profils. La concentration critique d'agrégation molaire, est calculée à partir de la concentration critique d'agrégation déterminée graphiquement et selon l'équation 2.13.

$$CAC_m = \frac{CAC_M}{M_{\text{copolymère}}} \quad \text{Eq. 2.13}$$

Le copolymère greffé (11-2) ($M_{n, \text{graft}, \text{RMN}} = 6700 \text{ g.mol}^{-1}$, $f_{\text{OEG}} = 49\%$), présente une CAC de 17 mg.L^{-1} , soit une valeur inférieure à celle du copolymère (11-3) ($M_{n, \text{graft}, \text{RMN}} = 7250 \text{ g.mol}^{-1}$, $f_{\text{OEG}} = 53\%$, $CAC = 41 \text{ mg.L}^{-1}$). Or, plus la valeur de la CAC est faible, plus le système est stable. Il semble donc que, conformément aux faits évoqués dans le précédent chapitre, une augmentation de la proportion d'unités hydrophiles ou une augmentation de la couche hydrophile aura tendance à déstabiliser l'édifice. Les concentrations critiques d'agrégation obtenues pour les deux copolymères sont en adéquation avec les concentrations critiques d'agrégation généralement obtenues pour des copolymères greffés.^{8,10}

2. Détermination des diamètres et des morphologies

Le diamètre des nano-objets formés a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et leur morphologie par microscopie électronique à transmission (TEM).

La Figure II-28 présente le profil typique obtenu pour les nano-objets formés en milieu aqueux par les copolymères greffés.

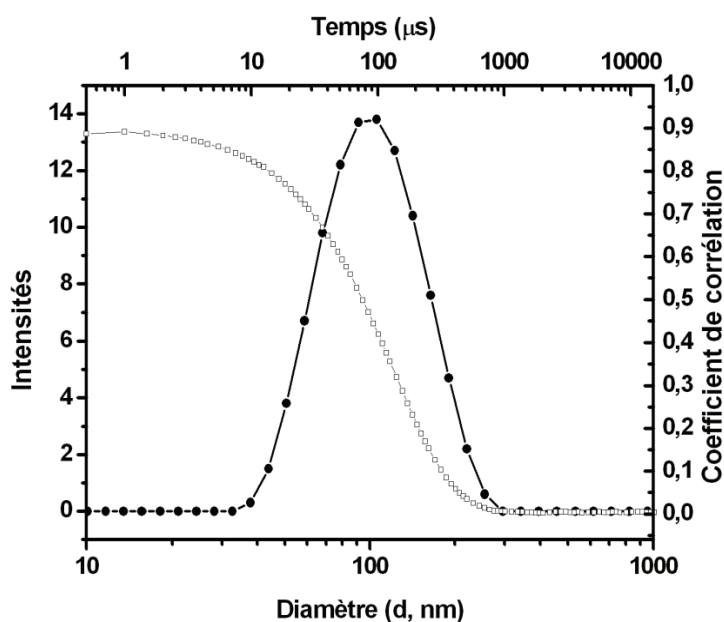


Figure II-28 Profil de distribution des tailles typique, solution à 3 g.L-1, par dissolution directe

On peut observer le diamètre hydrodynamique (D_H) des objets formés en fonction de leurs intensités ainsi que le coefficient de corrélation en fonction du temps, pour un angle de diffusion de 173° .

Les diamètres obtenus pour les copolymères greffés (11-2) et (11-3) sont présentés dans le Tableau II-7.

Tableau II-7 Détermination des CAC des copolymères greffés 11-2 et 11-3

Copolymères greffés	D_H nm	Pdl	f_{OEG}^a %	B^b
11-2	87	0,20	49	1,6
11-3	198	0,15	53	1,9

Conditions : préparés par dissolution directe

11-2 = $P(PGA_{20}\text{-co-GA}_{20}\text{-co-LA}_{60})\text{-graft-PEG550}_{15}$;

11-3 = $P(PGA_{28}\text{-co-GA}_{28}\text{-co-LA}_{44})\text{-graft-PEG550}_{26}$;

^a déterminé par l'équation 2-11, ^b déterminé par l'équation 2-12.

Il apparaît ainsi que le copolymère greffé (11-2) ($F_{\text{graft}} = 15\%$) présente un diamètre de 87 nm avec une faible dispersité. Le deuxième copolymère greffé (11-3), ($F_{\text{graft}} = 26\%$) affiche un diamètre d'objets supérieur (198 nm) toujours avec une faible dispersité.

L'analyse par DLS met à nouveau en évidence l'impact du taux de greffage des branches d'oligo(éthylène glycol), et l'importance du rapport entre les blocs hydrophobes et hydrophiles.^{30,31} Ainsi une augmentation de B ou une augmentation de f_{OEG} contribuera automatiquement à augmenter le diamètre hydrodynamique des objets.

Une comparaison entre la formation des nano-objets par dissolution directe et par nanoprécipitation a également été réalisée avec le copolymère (11-2) (Tableau II-8). Les résultats obtenus par nanoprécipitation sont similaires à ceux obtenus par dissolution directe, si l'on se réfère aux valeurs obtenues pour la mesure du diamètre hydrodynamique (D_H).

Tableau II-8 Comparaison des deux méthodes de préparation de nano-objets avec le copolymère 11-2, $F_{\text{graft}} = 15\%$, $f_{\text{OEG}} = 53\%$, $B = 1,6$

Méthodologie	D_H^a nm	PdI	CAC^b mg.L ⁻¹	CAC $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Dissolution directe	87	0,20	17	2,5
Nanoprécipitation	93	0,18	29	4,3

^a déterminé par DLS, ^b déterminé par spectroscopie de fluorescence

En revanche, l'évaluation de la CAC par fluorimétrie indique une valeur plus importante lorsque la nanoprécipitation est utilisée. Cela s'explique par le fait que, avec la dissolution directe, des micelles dynamiques sont formées. En revanche, lorsque la nanoprécipitation est employée, les macromolécules sont forcées à s'auto-assembler, et la CAC sera plus haute en fonction de l'affinité du squelette polyester avec le solvant utilisé (ici le DMSO).

La morphologie des nano-objets a été déterminée en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM). Cependant, cette technique donne des images de copolymères dans leur état déshydraté. Les échantillons de TEM sont préparés par dépôt d'une goutte de solution aqueuse de copolymère sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone, la grille est ensuite laissée sécher à l'air. Le cliché obtenu pour le copolymère (11-2) est présenté dans la Figure II-29. En se plaçant à une échelle nanométrique une morphologie de type cylindrique est observée. La détermination des tailles n'a pas été aisée, et semble plutôt large en comparaison des profils obtenus avec une faible dispersité par DLS, mais il semble que des micelles de type « rod-like » ou micelles

filaments soient obtenues. Celles-ci possèdent une longueur de 400 nm et une largeur de 100 nm. Ces résultats semblent être en accord avec les morphologies obtenues à partir de copolymères linéaires à blocs de PLA/PEG.³²

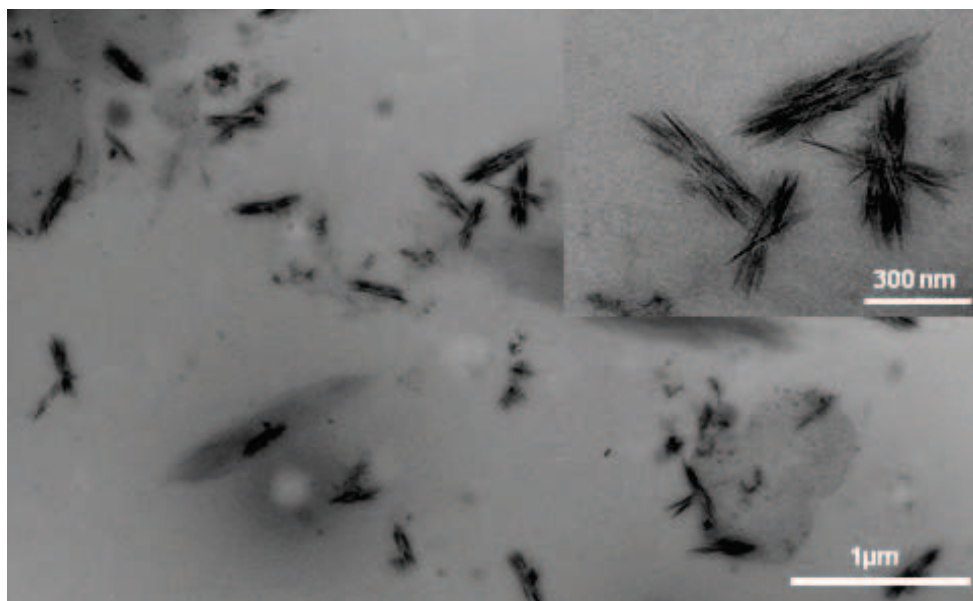


Figure II-29 Image TEM du copolymère 11-2, solution à 1g.L-1

Les différences relevées entre les objets observés par microscopie électronique à transmission et par diffusion dynamique de la lumière peuvent s'expliquer par l'état déshydraté des molécules en microscopie électronique à transmission, à l'état solide. Alors que par DLS, on observe le diamètre hydrodynamique en milieu aqueux, et donc hydraté.

Le même type d'objets est observé par microscopie électronique à transmission pour les deux copolymères. Il semblerait donc que la densité de greffage plus importante dans le cas du copolymère (11-3) n'influe pas sur la morphologie de l'auto-assemblage si ce n'est sur l'augmentation du diamètre.

Des analyses cryo-TEM pourraient être effectuées sur les copolymères en solution pour observer ainsi leur morphologie en milieu hydraté.

E. Encapsulation de principes actifs

Les propriétés physico-chimiques des nano-objets en milieu aqueux ont été déterminées. Il reste maintenant à étudier leur capacité à encapsuler des principes actifs (PA) hydrophobes. Notre choix de PA s'est orienté vers deux molécules, la curcumine et la clofazimine, de manipulation facile, c'est-

à-dire sans contraintes particulières au niveau hygiène et sécurité (à l'inverse du paclitaxel). Le suivi du principe actif sera effectué simplement par spectroscopie UV-vis.

Deux données, déjà abordées dans le précédent chapitre, doivent être définies, à savoir l'efficacité d'encapsulation, noté EE , et le taux de charge, noté DL selon les équations 2.14 et 2.15. Ce taux de charge sera calculé dans deux dimensions, massique et molaire, notées respectivement DL_M et DL_m selon les équations 2.15 et 2.16.

$$EE = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,initial}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.14}$$

$$DL_M = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,enc} + m_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.15}$$

$$DL_m = \frac{n_{PA,enc}}{n_{PA,enc} + n_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.16}$$

Ces équations permettront d'estimer l'efficacité de nos systèmes.

1. La Clofazimine

La clofazimine, ou (chloro-4 anilino)-3(chloro-4 phényl)-10 isopropylimino-2 dihydro-2,10 phénazine est une molécule hydrophobe dont la structure est indiquée dans le Schéma II-18.

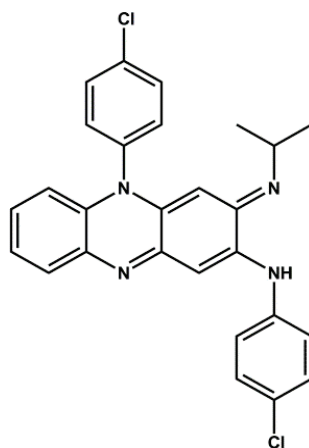


Schéma II-18 Structure chimique de la clofazimine

Cette molécule absorbe dans le domaine visible sous des formes protonée et déprotonée, qui donneront respectivement des solutions de couleur rouge/rose et orange. Cette molécule est utilisée dans le traitement de la lèpre (Lamprène®) et a démontré une activité anti-infectieuse et même anti-cancéreuse.^{33,34} Cependant, possédant une faible hydrosolubilité, (environ 0.1 mg.L⁻¹ à pH neutre), ce PA démontre aussi une lipophilie certaine qui facilite son absorption par les graisses, colorant ainsi la peau et s'accumulant au sein de l'organisme. De plus, son utilisation par voie orale entraîne d'autres

effets secondaires comme une irritation de l'intestin car elle y précipite en formant des cristaux. Face à tous ces inconvénients, une formulation par encapsulation dans un système polymère pourrait être une solution.³⁵

L'encapsulation de la clofazimine a été étudiée selon deux méthodes différentes, la dissolution directe et la nanoprécipitation. Pour déterminer l'efficacité d'encapsulation (*EE*) et le taux de charge (*DL*) de la clofazimine dans les nano-objets, une courbe de calibration UV-vis de la clofazimine dans un mélange acétone/eau (1/4) a été effectuée (Figure II-30). Pour les différentes concentrations en clofazimine, (5×10^{-5} à 2×10^{-6} M), l'absorbance a été mesurée au point isobestique des spectres protonée et non protonée de la clofazimine, à savoir pour une longueur d'onde λ de 468 nm.

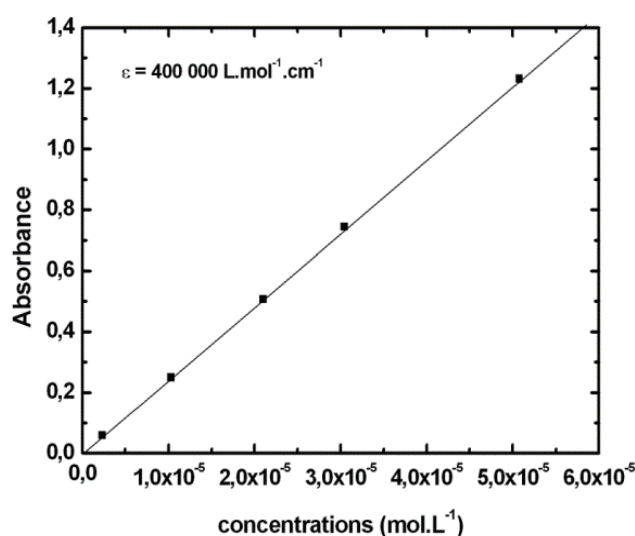


Figure II-30 Courbe de calibration de la clofazimine, $\lambda=468\text{nm}$

Avec cette droite, un coefficient d'extinction molaire ϵ de $400\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a été déterminé. Celui-ci permettra de retrouver la concentration de clofazimine présente dans les échantillons.

La préparation par dissolution directe consiste simplement à dissoudre le copolymère et la clofazimine dans de l'eau ultra-pure. La nanoprécipitation implique des étapes supplémentaires au cours desquelles le copolymère et la clofazimine sont dissous dans un solvant organique, le diméthylsulfoxyde, solution à laquelle de l'eau est ajoutée lentement, le tout suivi d'une dialyse pendant 48 heures. Après filtration et centrifugation, tous les échantillons, issus des deux méthodes ont été lyophilisés et pesés avant d'être analysés. Les résultats obtenus pour le copolymère (11-3), selon les deux méthodes, sont listés dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 Encapsulation de la clofazimine par le copolymère 11-3

Méthodologie	$n_{\text{clofa,enc}}$ μmol	$m_{\text{clofa,enc}}$ μg	n_{copo} μmol	EE^a %	DL_M^b %	DL_m^c %
Dissolution Directe	1,6	759	3,47	7,6	3	46
Nanoprécipitation	2,1	976	3,47	9,8	3,9	60,5

Conditions : 5 mg de clofazimine avec 25 mg de copolymères

^a calculé avec l'équation 2.14, ^b calculé avec l'équation 2.15, ^c calculé avec l'équation 2.16

Les données du Tableau II-9 semblent indiquer que, malgré une efficacité d'encapsulation légèrement supérieure pour la nanoprécipitation, la méthode de préparation influe peu sur le phénomène d'encapsulation. La Figure II-31 illustre le phénomène d'encapsulation de la clofazimine dans l'eau par le copolymère. En solution aqueuse, la clofazimine est insoluble (tube témoin T). Dans le cas de la clofazimine dans une solution aqueuse du copolymère à une concentration supérieure à la concentration critique d'agrégation (1 g.L^{-1}), une coloration homogène est observée, preuve que la clofazimine est solubilisée (A et B).

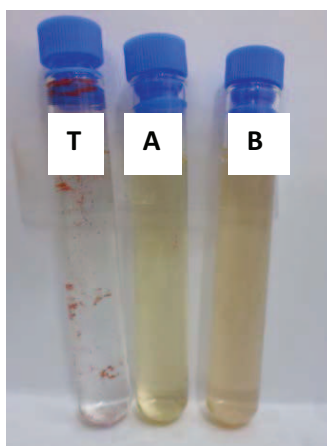


Figure II-31 Encapsulation de clofazimine par le copolymère 11-3
(T) clofazimine dans l'eau (A) Dissolution directe (B) Nanoprécipitation

Ces résultats montrent que notre copolymère forme un système capable d'encapsuler la clofazimine. Alors que la solubilité initiale de celle-ci est de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, on arrive à encapsuler dans nos systèmes polymériques $48,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Notre copolymère améliore ainsi la solubilité de la clofazimine par un facteur supérieur à 450.

2. La Curcumine

Dans un deuxième temps, l'encapsulation d'un autre composé modèle a été testée: la curcumine. La curcumine est un composé phénolique naturel de couleur jaune, présent dans *Curcuma Longa*. (Famille du gingembre et de la cardamome, Schéma II-19).

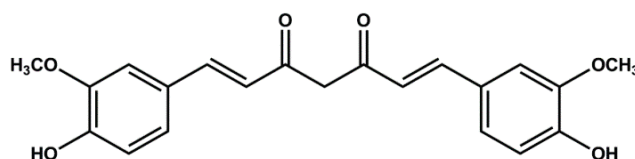


Schéma II-19 Structure chimique de la curcumine

Cette molécule est connue pour avoir de multiples activités : neuroprotectrices, hépatoprotectrices, néphroprotectrices, cardioprotectrices, antidiabétiques... De ce fait, cet antioxydant naturel possède de nombreuses applications pharmacologiques. Il existe d'ailleurs à l'heure actuelle de nombreuses études au stade préclinique et clinique relatives à son activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse...^{36,37} La Figure II-32 propose une vue d'ensemble des actions de la curcumine.³⁸

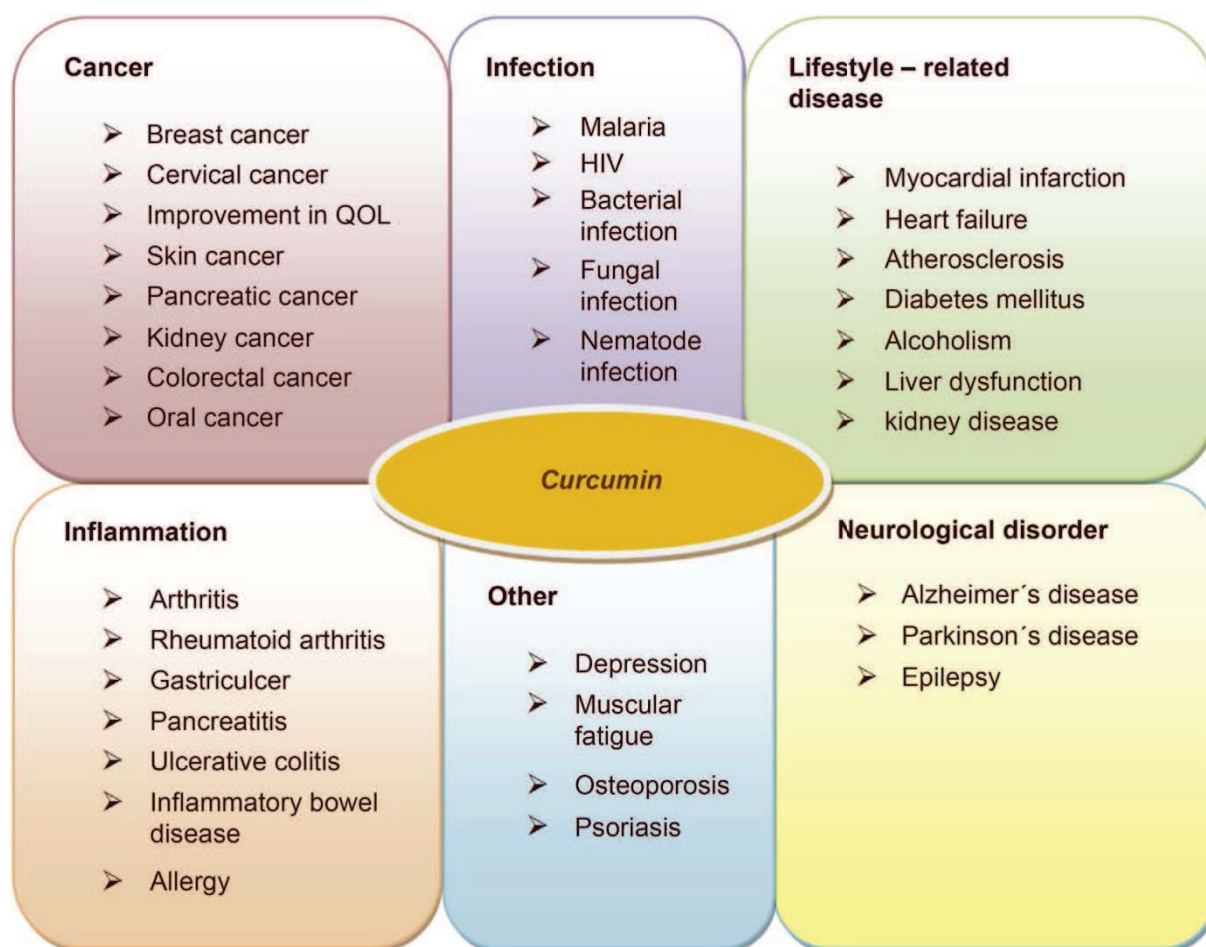


Figure II-32 Résumé des champs d'action de la curcumine³⁸

Cependant, la principale limitation relative à l'utilisation de cette molécule reste sa très faible hydrosolubilité ($11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ soit $30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Ainsi, l'encapsulation dans des systèmes polymères représente une solution pour palier à ce manque de solubilité. L'encapsulation de la curcumine a été testée par les deux méthodes utilisées précédemment, la dissolution directe et la nanoprécipitation. Comme pour la clofazimine, une courbe de calibration UV-vis a été réalisée en préparant une gamme de solutions de concentrations variables en curcumine dans le DMSO, ($2,5\times 10^{-5}$ à 2×10^{-6} M), et en se plaçant à une longueur d'onde λ de 425 nm. L'acquisition des différents spectres a permis de tracer cette droite, et de déterminer ainsi le coefficient d'extinction molaire ϵ , égal ici à $53\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

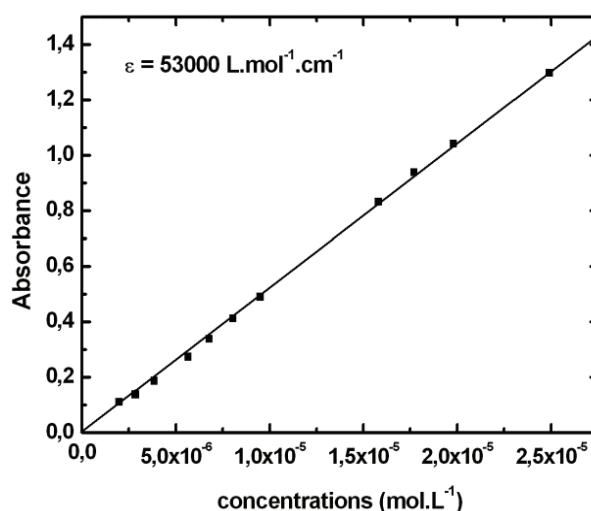


Figure II-33 Courbe de calibration de la curcumine, $\lambda=425\text{nm}$

Les résultats obtenus pour les encapsulations de curcumine avec le copolymère (11-3) par les deux méthodes sont listés dans le Tableau II-10. A première vue, les résultats d'encapsulation en utilisant la dissolution directe sont semblables à ceux de la clofazimine.

Tableau II-10 Encapsulation de la curcumine

Méthode	$n_{\text{cur,enc}}$ μmol	$m_{\text{cur,enc}}$ μg	n_{copo} μmol	EE^a %	DL_M^b %	DL_m^c %
Dissolution Directe	2	755	3,47	15,1	3	57,6
Nanoprécipitation	0,9	328	3,47	6,56	1,3	20,6

Conditions : 5 mg de curcumine avec 25 mg de copolymère

^a calculé avec l'équation 2.14, ^b calculé avec l'équation 2.15, ^c calculé avec l'équation 2.16

Par contre, la nanoprécipitation, loin de donner des résultats équivalents ou légèrement supérieurs nous donne des valeurs de moitié inférieures. Après avoir étudié le système, il semble qu'au cours du

processus de dialyse, une quantité substantielle de curcumine se retrouve adsorbée sur la membrane de dialyse (Figure II-34) diminuant ainsi l'efficacité d'encapsulation et le taux de charge réel. La méthode de dissolution directe est dans ce cas plus adaptée.



Figure II-34 Dialyse en milieu aqueux du copolymère et de la curcumine

La Figure II-35 illustre le phénomène d'encapsulation de la curcumine par le copolymère en solution dans l'eau. En solution aqueuse, la curcumine est insoluble (tube témoin A) et précipite au fond du tube. Dans une solution aqueuse du copolymère à une concentration supérieure à la CAC (1 g.L^{-1}), une coloration homogène est observée, preuve de la solubilisation de la curcumine (B et C). Conformément au phénomène évoqué précédemment, le tube B, préparé par dissolution directe, présente une coloration plus intense. Le tube C renferme la solution préparée par nanopréciptation.

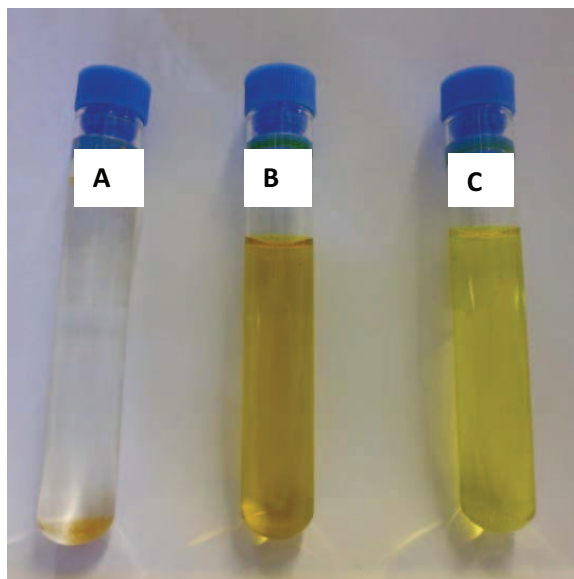


Figure II-35 Encapsulation de curcumine (A) témoin (B) Dissolution directe (C) Nanoprécipitation

Malgré l'efficacité réduite de la nanoprécipitation, les copolymères amphiphiles augmentent considérablement la solubilité de la curcumine, avec une solubilité apparente de 38 mg.L^{-1} et 16 mg.L^{-1} correspondant ainsi à une augmentation par un facteur minimal de 1500.

D'autres méthodes de formation comme le film-casting représentent une alternative à la nanoprécipitation et surtout à l'utilisation de la dialyse. Ainsi, un film est préparé par dissolution du copolymère et du PA dans un solvant type acétone suivi par son évaporation. Le film ainsi formé, renfermant le PA, sera ensuite dissous par addition lente d'eau ultra-pure et par faible agitation. Le traitement de la solution obtenue sera le même que pour les méthodologies précédentes, à savoir centrifugation et filtration puis lyophilisation avant d'être analysé. A cause du manque de matériau polymère, cette technique n'a pas pu être expérimentée, mais au vu des données de la littérature, et pour les prochains chapitres, cette technique sera utilisée pour remplacer la nanoprécipitation lorsque la curcumine sera encapsulée.

Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle dilactone fonctionnelle a été décrite. Elle est préparée en quatre étapes avec un rendement global de 10%. Cette dilactone, nommée 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione vient augmenter la librairie de monomères fonctionnels existants, notamment des dilactones dites cliquables.

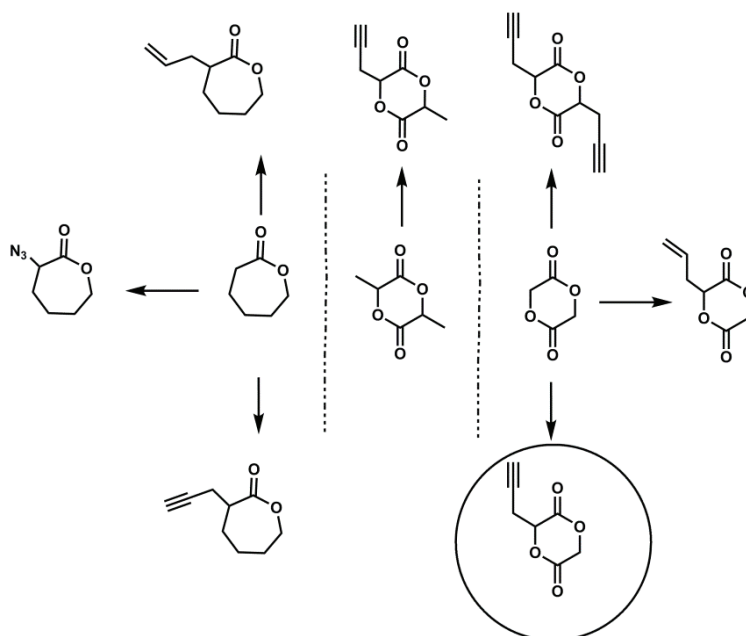


Figure II-36 Vue d'ensemble des dilactones fonctionnalisées "cliquables" existant à ce jour^{14,21,39-41}

Elle permet l'obtention d'un squelette polyester fonctionnalisé, par la copolymérisation avec du L-lactide. Le processus de polymérisation par ouverture de cycle avec divers systèmes catalytiques nous a permis d'obtenir des copolyesters statistiques comportant un taux de fonctionnalisation variable et contrôlé. Ces copolyesters fonctionnalisés ont ensuite permis d'obtenir des architectures greffées avec un squelette hydrophobe biodégradable et des branches hydrophiles d'oligo(éthylène glycol). Les copolymères greffés synthétisés ont été entièrement caractérisés, et la réaction de chimie « clic » a été confirmée par RMN DOSY avec une efficacité supérieure à 70%. Les propriétés physico-chimiques de tels copolymères ont été déterminées par fluorescence, DLS et TEM. Toutes les données indiquent que nos copolymères présentent une CAC basse et s'auto-assemblent en milieu aqueux pour former des nanoparticules de types micelles filaments avec des diamètres inférieurs à 200nm. La capacité de tels systèmes à encapsuler et augmenter la solubilité de deux composés modèles de PA a été démontrée. D'autres techniques, propres à la préparation de nanoparticules de type micelles chargées en PA, peuvent être étudiées dans le but d'augmenter l'efficacité du système.

Le prochain chapitre relatara la synthèse d'un copolymère peigne présentant une architecture différente au copolymère greffé synthétisé dans ce chapitre.

F. Bibliographie

1. Rieger, J., Bernaerts, K. V., Prez, F. E., Je, R. Lactone end-capped poly(ethylene oxide) as a new building block for biomaterials. *Macromolecules* **37**, 9738–9745 (2004).
2. Lutz, P. J., Peruch, F. in *Polym. Sci. Compr. Ref.* **6**, 511–542 (Elsevier B.V., 2012).
3. Coudane, J., Laurent, E., Vert, M. Poly(E-caprolactone)-based organogels and hydrogels with poly(ethylene glycol) cross-linkings. *Macromol. Rapid Commun.* **25**, 1865–1869 (2004).
4. Ponsart, S., Coudane, J., McGrath, J., Vert, M. Study of the grafting of bromoacetylated alpha-hydroxy-omega-methoxypoly(ethylene glycol) onto anionically activated poly(epsilon-caprolactone). *J. Bioact. Compat. Polym.* **17**, 417–432 (2002).
5. Parrish, B., Emrick, T. Aliphatic polyesters with pendant cyclopentene groups: controlled synthesis and conversion to polyester-graft-PEG copolymers. *Macromolecules* **37**, 5863–5865 (2004).
6. Wu, P., Feldman, A. K., Nugent, A. K., Hawker, C. J., Scheel, A., Voit, B., Pyun, J., Fréchet, J. M. J., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(i)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 3928–3932 (2004).
7. Darcos, V., Al Tabchi, H., Coudane, J. Synthesis of PCL-graft-PS by combination of ROP, ATRP, and click chemistry. *Eur. Polym. J.* **47**, 187–195 (2011).
8. Darcos, V., El Habnoui, S., Nottelet, B., El Ghzaoui, A., Coudane, J. Well-defined PCL-graft-PDMAEMA prepared by ring-opening polymerisation and click chemistry. *Polym. Chem.* **1**, 280–282 (2010).
9. Emrick, T., Parrish, B., Breitenkamp, R. B. PEG- and peptide-grafted aliphatic polyesters by click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7404–7410 (2005).
10. Guillermin, B., Darcos, V., Lapinte, V., Monge, S., Coudane, J., Robin, J. J. Synthesis and evaluation of triazole-linked poly(epsilon-caprolactone)-graft-poly(2-methyl-2-oxazoline) copolymers as potential drug carriers. *Chem. Commun.* **48**, 2879–2881 (2012).
11. Riva, R., Schmeits, S., Stoffelbach, F., Jérôme, C., Jérôme, R., Lecomte, P. Combination of ring-opening polymerization and “click” chemistry towards functionalization of aliphatic polyesters. *Chem. Commun.* 5334–5336 (2005).
12. Zhang, K., Wang, Y., Zhu, W., Li, X., Shen, Z. Synthesis, characterization, and micellization of PCL-g-PEG copolymers by combination of ROP and “Click” chemistry via “Graft onto” method. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **50**, 2045–2052 (2012).
13. Vert, M. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Die Angew. Makromol. Chemie* **166/167**, 155–168 (1989).

14. Jiang, X., Vogel, E. B., Smith, M. R., Baker, G. L. "Clickable" polyglycolides: Tunable synthons for thermoresponsive, degradable polymers. *Macromolecules* **41**, 1937–1944 (2008).
15. Wang, W., Li, T., Yu, T., Zhu, F. Synthesis of multiblock copolymers by coupling reaction based on self-assembly and click chemistry. *Macromolecules* **41**, 9750–9754 (2008).
16. Wada, M., Fukuma, T., Morioka, M., Takahashi, T., Miyoshi, N. A novel aqueous Barbier-Grignard-type allylation of aldehydes in a Mg/BiCl₃ bimetal system'. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8045–8048 (1997).
17. Leemhuis, M., Akeroyd, N., Kruijtzter, J. a. W., van Nostrum, C. F., Hennink, W. E. Synthesis and characterization of allyl functionalized poly(α -hydroxy)acids and their further dihydroxylation and epoxidation. *Eur. Polym. J.* **44**, 308–317 (2008).
18. Gerhardt, W. W. Noga, D. E., Hardcastle, K. I., García, A. J., Collard, D. M., Weck, M. Functional lactide monomers: methodology and polymerization. *Biomacromolecules* **7**, 1735–1742 (2006).
19. Kiesewetter, M. K., Shin, E. J., Hedrick, J. L., Waymouth, R. M. Organocatalysis: opportunities and challenges for polymer synthesis. *Macromolecules* **43**, 2093–2107 (2010).
20. Fèvre, M., Pinaud, J., Gnanou, Y., Vignolle, J., Taton, D. N-Heterocyclic carbenes (NHCs) as organocatalysts and structural components in metal-free polymer synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 2142–2172 (2013).
21. Yu, Y. Zou, J., Yu, L., Ji, W., Law, W-C., Cheng, C. Functional polylactide-g-paclitaxel-g-poly(ethylene glycol) by azide - alkyne click chemistry. *Macromolecules* **44**, 4793–4800 (2011).
22. Nederberg, F., Connor, E. F., Moller, M., Glauser, T., Hedrick, J. L. New paradigms for organic catalysts: The first organocatalytic living polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 2712–2715 (2001).
23. Meldal, M. Polymer "clicking" by CuAAC reactions. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 1016–1051 (2008).
24. Rostovtsev, V. V, Green, L. G., Fokin, V. V, Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 2596 (2002).
25. Xie, F., Sivakumar, K., Zeng, Q B., Bruckman, M A., Hodges, B., Wang, Q. A fluorogenic "click" reaction of azidoanthracene derivatives. *Tetrahedron* **64**, 2906–2914 (2008).
26. Mallard, I., Landy, D., Bouchemal, N., Fourmentin, S. Synthesis and inclusion ability of anthracene appended beta-cyclodextrins: unexpected effect of triazole linker. *Carbohydr. Res.* **346**, 35–42 (2011).
27. Hiki, S., Kataoka, K. A facile synthesis of azido-terminated heterobifunctional poly(ethylene glycol)s for "click" conjugation. *Bioconjug. Chem.* **18**, 2191–2196 (2007).

28. Binder, W. H., Sachsenhofer, R. "Click" chemistry in polymer and materials science. *Macromol. Rapid Commun.* **28**, 15–54 (2007).
29. Bakkour, Y., Darcos, V., Li, S., Coudane, J. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as a powerful tool for amphiphilic block copolymer characterization and for critical micelle concentration. *Polym. Chem.* **3**, 2006–2010 (2012).
30. Brannan, A. K., Bates, F. S. ABCA tetrablock copolymer vesicles. *Macromolecules* **37**, 8816–8819 (2004).
31. Moughton, A. O., Hillmyer, M. A., Lodge, T. P. Multicompartment block polymer micelles. *Macromolecules* **45**, 2–19 (2012).
32. Wu, X., El Ghzaoui, A., Li, S. Anisotropic self-assembling micelles prepared by the direct dissolution of PLA/PEG block copolymers with a high PEG fraction. *Langmuir* **27**, 8000–8008 (2011).
33. Kumar, B., Kaur, S., Kaur, I., Gangowar, D. N. More about clofazimine --3 years experience and review of literature. *Indian J. Lepr.* **59**, 63 (1987).
34. Banerjee, D. K., Ellard, G. A., Gammon, P. T., Waters, M. F. R. Some observations on pharmacology of clofazimine (B663). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**, 1110 (1974).
35. Ramu, G., Iyer, G. G. Side effects of clofazimine therapy. *Lepr. India* **48**, 722 (1976).
36. Yallapu, M. M., Jaggi, M., Chauhan, S. C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov. Today* **17**, 71–80 (2012).
37. Srivastava, R. M., Singh, S., Dubey, S. K., Misra, K., Khar, A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 331–341 (2011).
38. Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R. M., Hennink, W. E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **35**, 3365–3383 (2014).
39. Dove, A. P., Pounder, R. J. Towards poly(ester) nanoparticles: recent advances in the synthesis of functional poly(ester)s by ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* **1**, 260–271 (2010).
40. Jerome, C., Lecomte, P., Riva, R. Combination of ring-opening polymerization and "click chemistry": toward functionalization and grafting of poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules* **40**, 796–803 (2007).
41. Yu, Y., Zou, J., Cheng, C. Synthesis and biomedical applications of functional poly(α -hydroxyl acid)s. *Polym. Chem.* **5**, 5854–5872 (2014).

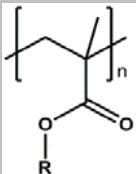
Chapitre III : Synthèse de copolymères amphiphiles de type peigne à base de poly(acide lactique) et de poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol))

Introduction

Au cours des dernières années, des copolymères à base de polyester et de poly(éthylène glycol) d'architecture moléculaire plus complexe ont été synthétisés.^{1,2} Les copolymères « brush-like » ou peigne, à base de macromonomère PEG tel que le méthacrylate de poly(éthylène glycol) (PEGMA) ou plus exactement le méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA) ont attiré l'attention.³ En effet, après polymérisation, le (P(OEGMA)) révèle les mêmes propriétés et caractéristiques que son homologue linéaire, le PEG.⁴⁻⁶ Ainsi, le polymère se révèle biocompatible et la bioéliminable, tout en ajoutant des propriétés potentielles de thermosensibilité.⁶ Ainsi, des P(OEGMA)s parfaitement définis, avec des masses molaires contrôlées et de faible dispersité peuvent être préparés par des techniques de polymérisation comme la polymérisation radicalaire contrôlée.

Les poly(méthacrylate)s sont par définition des polymères obtenus par polymérisation en chaîne de monomères méthacrylate. L'avantage de l'utilisation de poly(méthacrylate)s réside dans la possibilité de fonctionnalisation élevée du monomère (groupement R) (Tableau III-1), modifiant ainsi ses propriétés intrinsèques et son utilisation.

Tableau III-1 Famille des polyméthacrylates

Nom de la famille de polymères	Structure du motif
Poly(méthacrylate)	
R=PEG : poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol))	
R=CH₃ poly(méthacrylate de méthyle)	
R=H poly(acide méthacrylique)	

Les monomères porteurs de différents groupements R peuvent être facilement synthétisés et donne l'accès à un grand nombre de monomères de type hydrophobe, pH-sensible, thermo-dépendant, ou encore hydrophile. Certains des polymères obtenus se révèlent biocompatible et non toxique. Le

poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) par exemple est utilisé pour certaines applications biomédicales comme les prothèses dentaires ou encore les implants ophtalmiques.⁷

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la (co)polymérisation de monomères méthacryliques tels que l'OEGMA. Ils peuvent être polymérisés par voies anionique, cationique et radicalaire notamment radicalaire contrôlée de type ATRP (*atom transfer radical polymerization*)⁸⁻¹⁰ ou RAFT (*reversible addition-fragmentation transfer polymerization*).^{11,12} Cependant, nous ne développerons ici que la polymérisation radicalaire.

La polymérisation radicalaire classique ou conventionnelle, développée dans les années 50, a permis d'obtenir des polymères de hautes masses molaires dans les milieux académiques et industriels.¹³ Cette méthode est largement employée car elle permet de polymériser une grande bibliothèque de monomères en utilisant des conditions expérimentales douces où la seule condition est l'absence d'oxygène. Le processus a lieu selon trois étapes principales :

- L'amorçage, au cours de laquelle le radical est créé.
- La propagation, au cours de laquelle la chaîne continue de croître et d'incorporer des monomères.
- La terminaison, qui se produit selon plusieurs phénomènes. On parle d'arrêt par transfert de chaîne, d'arrêt par recombinaison ou encore d'arrêt par dismutation.

L'inconvénient majeur de ce type de polymérisation réside dans les radicaux générés qui, à l'inverse d'une polymérisation anionique ou cationique, peuvent réagir les uns avec les autres et ainsi se recombiner pour former des polymères de hautes masses molaires (50 000 à 100 000 g.mol⁻¹) avec des dispersités relativement élevées.

Au cours des 20 dernières années, une nouvelle technique de polymérisation dénommée polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) est apparue. Cette nouvelle forme de polymérisation permet non seulement de contrôler les masses molaires grâce à un équilibre dynamique entre une espèce dormante et une espèce active, mais également de créer de nouvelles architectures en contrôlant plus finement le processus et l'architecture macromoléculaire formée.¹⁴ Plusieurs types de polymérisation radicalaire contrôlée existent, telles que la polymérisation utilisant des nitroxydes (NMP ou *nitroxyde mediated polymerization*)^{15,16}, la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)⁸⁻¹⁰ ou encore la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT).^{11,12}

L'ATRP a été simultanément rapportée par Sawamoto¹⁷ et Matyjaszewski¹⁸ avec deux systèmes catalytiques métalliques différents. Le premier utilise du ruthénium et le second utilise du cuivre. La

chaîne principale est activée avec un système catalytique utilisant un halogénure de métal en présence d'une espèce organique ou macroamorceur halogéné.¹⁹ Grâce aux différents états d'oxydation du métal, celui-ci peut soustraire l'halogène à l'espèce organique amorçant ainsi la polymérisation. Le type de macroamorceur requis pour réaliser cette polymérisation est facilement synthétisable. Ainsi, de nombreux macroamorceurs ont été obtenus et ont permis l'obtention de polymères avec une architecture et une topologie complexes mais contrôlées.

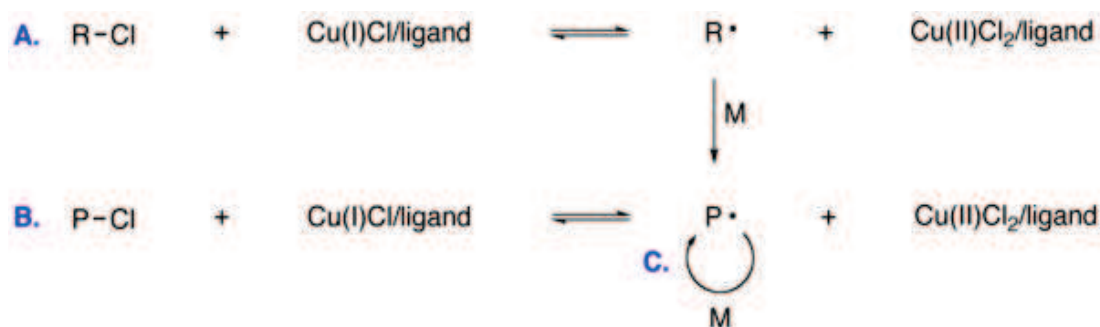


Schéma III-1 processus de la polymérisation radicalaire contrôlée ATRP

Récemment, de nouveaux systèmes dans lesquels les quantités de cuivre requises sont réduites, comme par exemple la polymérisation radicalaire où l'activateur est (ré)génééré par transfert d'électron (AGET ou ARGET *Activator (Re)Generated by Electron Transfer*), ont également été développés.²⁰⁻²⁴

L'ATRP a permis la création de systèmes macromoléculaires d'une grande complexité avec de nombreuses applications potentielles.

Même si cette méthodologie permet de polymériser les méthacrylates tels que l'OEGMA, elle est limitée car il existe un certain nombre de monomères qui sont difficilement polymérisables en ATRP. En effet, de nombreux monomères hydrophiles, porteurs de fonctions acides et/ou phosphorées sont susceptibles d'interagir avec le système catalytique et perturbent le processus de polymérisation.

La RAFT (*reversible addition-fragmentation transfer polymerization*) s'est développée à la fin des années 90. La RAFT est, comme l'ATRP, une méthode de polymérisation radicalaire contrôlée utilisant des agents de transfert de chaînes, mais cette fois-ci réversible. Le principal avantage de ce type de technique est la grande variété de monomères polymérisables avec peu de restrictions concernant le solvant.^{25,26} De nos jours, la modification des bouts de chaînes est possible post-polymérisation pour permettre d'apporter davantage de fonctionnalisation.²⁷

Cependant, quelques inconvénients sont également relevés. La synthèse des agents de transfert (CTA) est difficile. Peu de ces molécules sont disponibles commercialement, et celles qui le sont se révèlent coûteuses. De plus, la modification des extrémités de chaînes de polymères préformés servant à amorcer la polymérisation de type RAFT est moins triviale que dans l'utilisation d'amorceur d'ATRP.²⁸

Ainsi, la polymérisation radicalaire contrôlée de type ATRP apparaît plus adaptée pour la polymérisation des monomères OEGMA, dans le cas de l'utilisation d'un bloc polymère servant de macroamorceur.

Ce chapitre décrit la synthèse de copolymères peigne tribloc amphiphiles à base de PLA et d'OEGMA par combinaison de la ROP et de l'ATRP. Leurs propriétés physico-chimiques et leurs capacités à encapsuler des principes actifs ont été déterminés. Des copolymères peigne dibloc à base de PLA et OEGMA ont également été synthétisés et comparés aux peigne tribloc.

A. Synthèse de copolymères peigne tribloc P(OEGMA)-*b*-PLA-*b*-P(OEGMA)

1. Synthèse du macroamorceur difonctionnel

a. Synthèse d'un poly(acide lactique) téléchélique

Un poly(acide lactique) α,ω dihydroxylé (PLA(OH)₂) portant deux fonctions hydroxyle en bout de chaîne a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle de L-lactide en solution à 80°C en utilisant un amorceur difonctionnel, le 1,4-benzène diméthanol (I) et un catalyseur métallique, l'octoate d'étain (Schéma III-2).

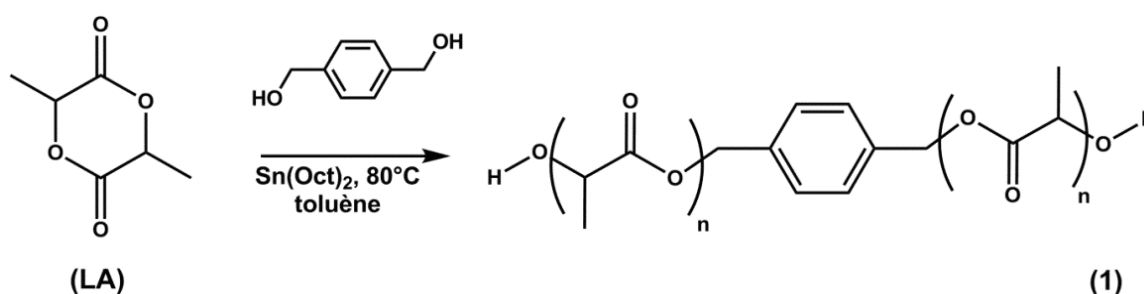


Schéma III-2 Synthèse du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé PLA(OH)₂

Le Tableau III-2 regroupe les résultats obtenus pour la synthèse des PLA(OH)₂ avec deux ratios L-lactide/amorceur différents (20 et 50). Les copolymères ont été caractérisés par spectroscopie RMN ¹H, MALDI-TOF et chromatographie d'exclusion stérique.

Tableau III-2 Caractérisation des polymères PLA(OH)₂

	[LA]/[I]/[Sn]	Temps h	Conv LA ^a %	M _{n,th} ^b g.mol ⁻¹	M _{n,RMN} ^c g.mol ⁻¹	DP _{PLA} ^d	M _{n,CES} g.mol ⁻¹	Đ _M
1-1	20:1:0.2	4	98	3000	3000	20	4900	1,10
1-2	50:1:0.2	6	95	7000	6200	42	10400	1,10

Conditions à 80°C dans le toluène

^a déterminé par RMN ¹H, ^b calculé selon l'équation 3.1, ^c calculé selon l'équation 3.2, ^d calculé selon l'équation 3.3

Pour les polyesters préparés, les taux de conversions calculés à partir des RMN ¹H sont supérieurs à 90%. La RMN ¹H typique du polyester est présentée Figure III-1. Les pics à δ 5,14 et 1,55 ppm sont attribués au squelette polyester. Le pic à δ 7,30 ppm est associé aux protons aromatiques de l'amorceur. Le signal de faible intensité à δ 4,33 ppm correspond aux protons en α des fonctions hydroxyle terminales.

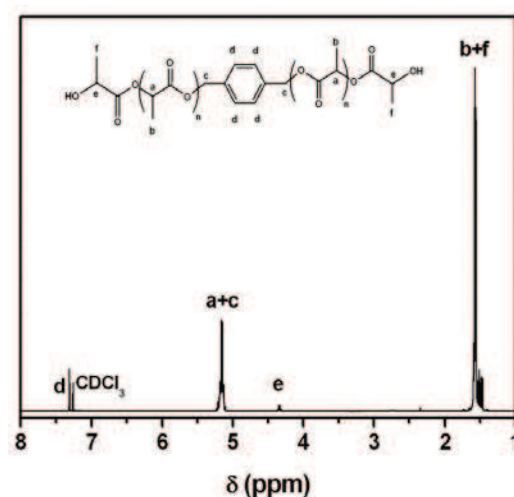


Figure III-1 Spectre RMN ¹H du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé (PLA(OH)₂) possédant un DP_{PLA} de 20

La masse molaire théorique est calculée à partir de l'équation 3.1. Le degré de polymérisation DP_{PLA} et la masse molaire expérimentale M_{n,RMN} sont calculés à partir des intensités relatives des signaux RMN ¹H des protons b des motifs acide lactique et des protons d du groupement aromatique à partir des équations 3.2 et 3.3.

$$M_{n,th} = \frac{[LA] \times 144}{[I]} \times conv \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$M_{n,RMN} = \frac{1/6 I_b \times 144}{1/4 I_d} + 138 \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$DP_{PLA} = \frac{1/6 I_b}{1/4 I_d} \quad \text{Eq. 3.3}$$

D'après le Tableau III-2, les masses molaires et les degrés de polymérisation déterminés par RMN ^1H sont proches des valeurs théoriques. Il est également intéressant de noter que les masses molaires estimées par CES avec une calibration polystyrène sont légèrement supérieures à celles déterminées par RMN ^1H . En effet, il est connu que les masses molaires d'homopolymères de PLA sont surestimées. Un comportement similaire est observé avec la poly(ϵ -caprolactone).²⁹ Cette surestimation peut être corrigée avec un facteur correcteur pour obtenir des masses molaires réelles.³⁰ Une distribution étroite des masses molaires est observée avec des dispersités (D_M) inférieures à 1,1.

Les polyesters ont également été caractérisés par spectroscopie MALDI-TOF (Figure III-2). Une distribution binômiale des masses molaires est observée. Les données RMN ^1H et CES (Tableau III-2) sont en adéquation avec les analyses MALDI-TOF. Les masses molaires déterminées par MALDI sont proches des valeurs calculés par RMN ^1H . De plus, ces analyses nous ont permis de confirmer la présence de chaînes polymères fonctionnalisées avec deux groupements hydroxyle terminaux, et ceci de manière quantitative. La population de faible intensité est attribuée à des réactions de trans-estérification. Néanmoins, les réactions de trans-estérification n'influent pas sur la structure des polyesters.

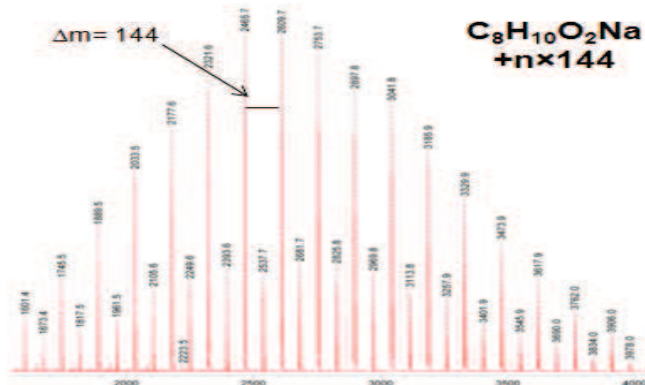


Figure III-2 Spectre MALDI-TOF du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé $\text{PLA}(\text{OH})_2$ possédant un DP_{PLA} de 20

Ces différentes analyses ont confirmé que les polyesters étaient préparés de manière contrôlée avec des fonctionnalités terminales conservées.

b. Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(L-acide lactique)

Le macroamorceur de PLA avec deux sites d'amorçage d'ATRP a été préparé en une étape à partir du PLA(OH)₂. L'estérification des fonctions alcools est réalisée en milieu basique par réaction du bromure de 2-bromoisobutyryle en présence de la triéthylamine en solution dans le THF à température ambiante pendant 24 heures (Schéma III-3).

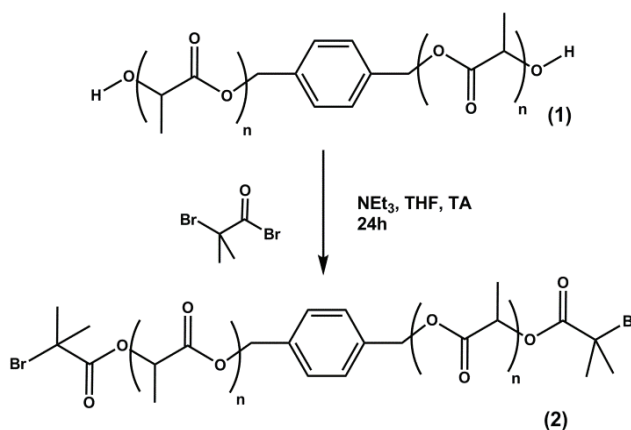


Schéma III-3 Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) PLA(Br)₂

Les caractéristiques du macroamorceur α,ω -dibromopoly(L-acide lactique) (PLA(Br)₂) sont présentées dans le Tableau III-3. Les polymères 2-1 et 2-2 ont respectivement été obtenus à partir des PLA(OH)₂ 1-1 et 1-2.

Tableau III-3 Caractérisation des polymères PLA(Br)₂

	PLA	[PLA]/[NEt ₃]/[RCO ₂ Br]	$M_{n,th}^a$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^b$ g.mol ⁻¹	DP _{PLA} ^c	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	\bar{D}_M
2-1	PLA(Br) ₂	1:1.5:1.5	2900	2800	20	5700	1,10
2-2	PLA(Br) ₂	1:1.5:1.5	6900	6300	42	10000	1,14

Conditions à TA dans le THF pendant 24 heures

^a calculé selon l'équation 3.1, ^b calculé selon l'équation 3.2

La Figure III-3 présente le spectre RMN ¹H du PLA(Br)₂. La fonctionnalisation des bouts de chaînes par les groupements 2-bromo-isobutyrate est confirmée par le déplacement du signal du proton en α de la fonction hydroxyle de δ 4,33 à 5,14 ppm dans le massif a des protons des motifs acide lactique. De plus, l'apparition d'un doublet à δ 1,94 ppm, noté e+e' est attribué aux protons des groupements

méthylènes adjacents au brome. Par RMN, le taux de fonctionnalisation des bouts de chaînes est quantitatif. Cette estimation a été confirmée par spectroscopie MALDI-TOF.

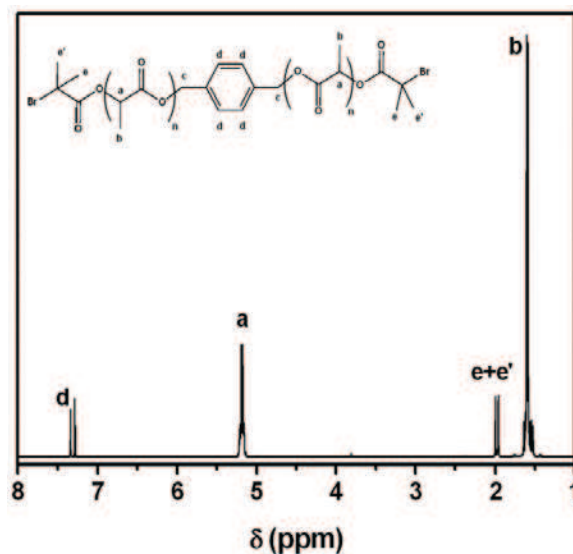


Figure III-3 Spectre RMN ^1H de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) $\text{PLA}(\text{Br})_2$ avec un DP_{PLA} de 20

Les masses molaires et le degré de polymérisation des $\text{PLA}(\text{Br})_2$, calculés avec les équations définies précédemment, révèlent des valeurs similaires au $\text{PLA}(\text{OH})_2$.

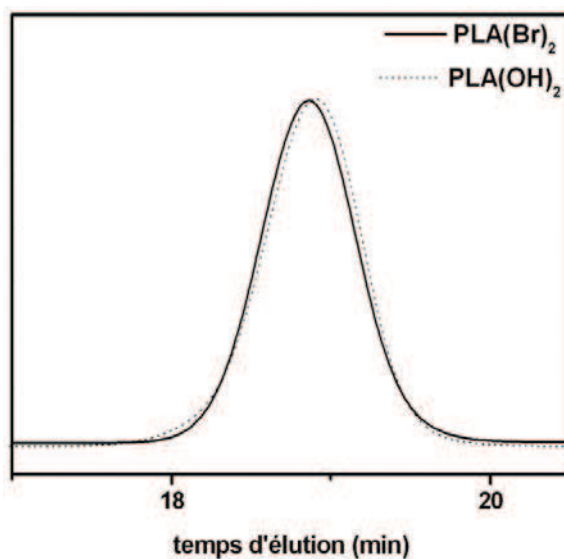


Figure III-4 CES du polymère 1.1 ($M_n=3000 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1.1$, trait continu) et du polymère 2.1 ($M_n=2800 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1.1$, trait pointillés)

De même, la CES témoigne d'une légère augmentation des masses molaires, sans modifier les dispersités (\mathcal{D}_M) indiquant que la réaction d'estérification ne provoque pas de coupure de chaînes (Figure III-4).

Les deux macroamorceurs à base de PLA ont été parfaitement caractérisés et montrent la présence de deux sites d'amorçage. Ces macroamorceurs peuvent servir maintenant à la synthèse de copolymères amphiphiles tribloc.

2. Synthèse des copolymères tribloc par polymérisation radicalaire de type ATRP

Le macroamorceur 2-1 a été utilisé pour préparer une série de copolymères tribloc amphiphiles à partir de trois méthacrylates d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA(OMe)) de masses molaires variant de 300 à 1000 g.mol⁻¹ (Schéma III-4).

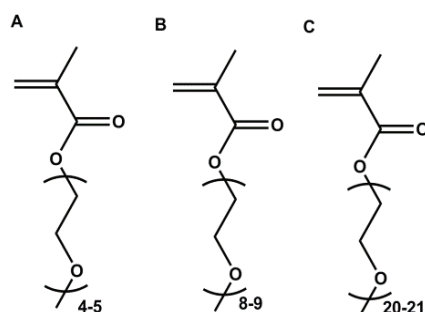


Schéma III-4 Monomères OEGMA(OMe) (A) 300 g.mol⁻¹ ; (B) 475 g.mol⁻¹ ; (C) 1000 g.mol⁻¹

a. Etude cinétique de la polymérisation par ATRP du méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) OEGMA₃₀₀

Afin de déterminer les conditions optimales de polymérisation radicalaire, différentes polymérisations ont été effectuées avec le monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA(OMe)) de 300 g.mol⁻¹, noté OEGMA₃₀₀, en étudiant l'influence du solvant et du système catalytique.

i. Influence du solvant

La polymérisation de ce monomère méthacrylate a été effectuée dans trois solvants différents en utilisant un complexe CuBr/PMDETA comme système catalytique (Schéma III-5).

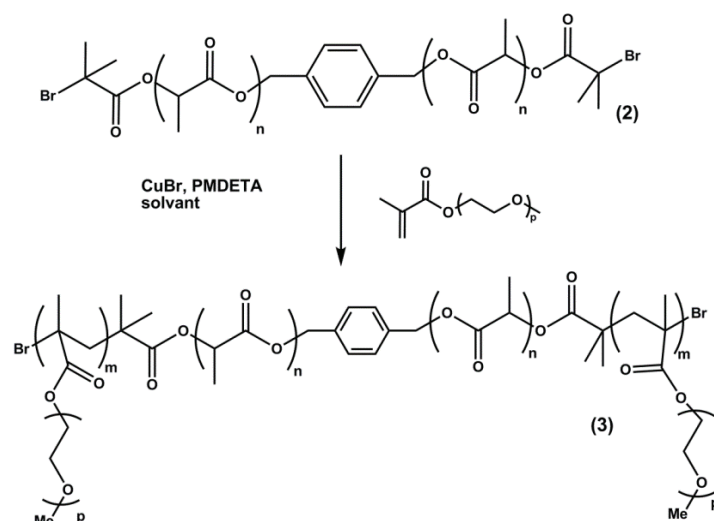


Schéma III-5 synthèse générale des copolymères tribloc

Les résultats obtenus pour les polymérisations en fonction du solvant utilisé sont listés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 Caractérisation des copolymères tribloc P(OEGMA)-*b*-PLA-*b*-P(OEGMA)

Copolymères	Solvant	Température °C	Conv ^a %	$M_{n,th}^b$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^c$ g.mol ⁻¹	[OEGMA] /[PLA] _{RMN} ^d	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	\bar{D}_M
3-1	DMSO	90	89	16000	11700	29/1	25000	1,5
3-2	THF	60	98	17000	13500	35/1	25000	1,6
3-3	Anisole	60	86	15900	13800	36/1	13700	1,2

Conditions : $[\text{PLLA}(\text{Br})_2]/[\text{CuBr}]/[\text{PMDETA}] = 1/2/4$ et $[\text{OEGMA}]/[\text{LA}] = 50/19$ $M(\text{OEGMA}) = 300 \text{ g.mol}^{-1}$

^a déterminé par RMN ^1H ; ^b calculé selon l'équation 3.4, ^c calculé selon l'équation 3.5, ^d déterminé par RMN ^1H

Les copolymères ont été purifiés sur colonne d'alumine basique et analysés par RMN ^1H , DOSY et CES. Les solvants utilisés sont le tétrahydrofurane (THF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'anisole. Le toluène a été écarté en raison d'une faible solubilité du macroamorceur PLA.

La Figure III-5 présente le spectre RMN ^1H typique obtenu pour la synthèse de ces copolymères tribloc.

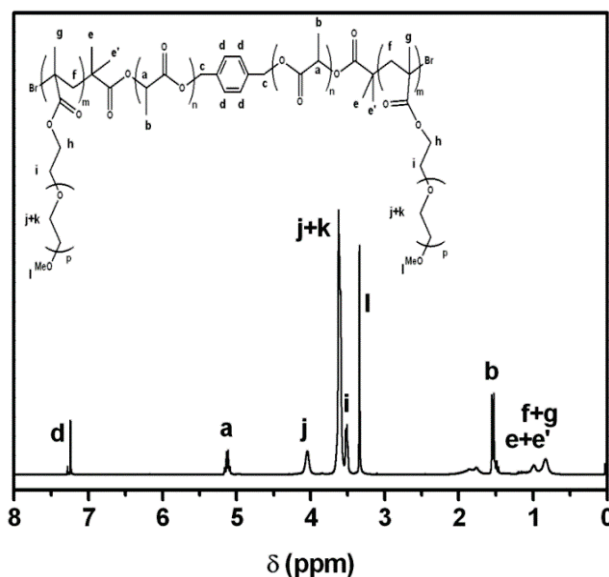


Figure III-5 Spectre RMN ^1H typique du copolymère tribloc

Le signal à δ 3,36 ppm est attribué aux protons des groupements méthoxy en bout de chaîne des oligo(éthylène glycol)s. Les signaux à δ 5,14 et 1,51 ppm restent caractéristiques des protons du squelette PLA. Les pics à δ 4,06 et 3,53 ppm sont assignés aux protons méthylène des branches oligo(éthylène glycol). Ceux-ci permettent, avec l'équation 3.5, de calculer les masses molaires expérimentales $M_{n, \text{RMN}}$ et de déterminer la composition en unités lactide par rapport aux branches oligo(éthylène glycol).

$$M_{n, \text{th}} = (M_n(\text{PLLA}(\text{Br})_2) + [\text{OEGMA}] \times M_n(\text{OEGMA})) \times \text{conv} \quad \text{Eq. 3.4}$$

$$M_{n, \text{RMN}} = (M_n(\text{PLLA}(\text{Br})_2) + \frac{I_h}{2 \times I_a / DP_{\text{PLLA}(\text{Br})_2}} \times M_n(\text{OEGMA})) \quad \text{Eq. 3.5}$$

Les copolymères ont également été caractérisés par RMN DOSY. Le principe, décrit dans le chapitre 2, met en évidence la polymérisation des branches d'OEGMA sur le squelette PLA (Figure III-6). En effet, il est observé sur ce spectre que toutes les entités présentes en solution migrent en fonction d'un seul et même coefficient de diffusion, indiquant que les différents blocs sont rattachés à une seule et même macromolécule.

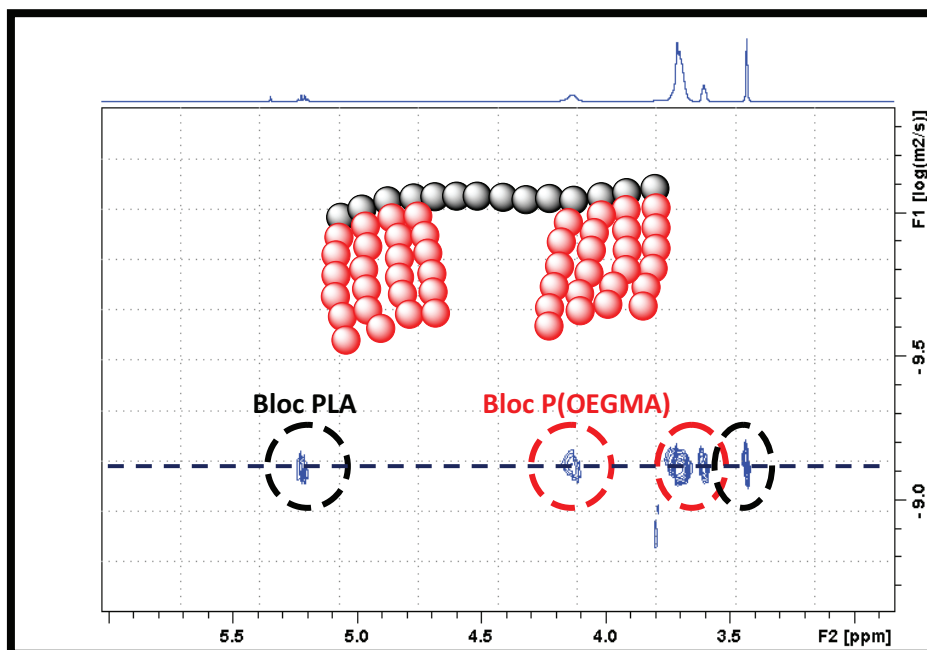


Figure III-6 Spectre RMN DOSY des copolymères tribloc

L'obtention d'un copolymère tribloc est confirmée, quel que soit le solvant utilisé.

À partir des résultats présentés dans le Tableau III-4, il apparaît que tous les copolymères présentent un taux de conversion du méthacrylate important et des masses molaires expérimentales proches des masses molaires théoriques. Cependant, il apparaît également que des dispersités élevées soient obtenues avec le DMSO et le THF. Il a donc été décidé de continuer les synthèses en utilisant l'anisole comme solvant d'ATRP. En effet, ce système fournit des copolymères mieux définis, avec des dispersités D_M inférieures à 1,3 en parallèle d'une bonne corrélation entre les masses molaires théoriques et expérimentales. (Tableau III-4)

ii. Influence du système catalytique

La suite des synthèses a été effectuée dans l'anisole à 60°C avec différents ratios de monomère OEGMA(OMe) (300 g.mol^{-1}) par rapport au macroamorceur $[\text{OEGMA}_{300}]/[\text{PLA}]$. Afin de vérifier le caractère contrôlé de l'ATRP, des suivis cinétiques ont été réalisés par spectroscopie RMN ^1H et CES. Pour ceci, les courbes de l'évolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps ainsi que de l'évolution des masses molaires (M_n) et des dispersités en fonction de la conversion ont été tracées. À noter que $\ln([M]_0/[M])$ peut être exprimé sous la forme $\ln(1/(1-\text{conversion}))$ puisque $[M] = ([M] - [M]_0) \cdot \text{conversion}$. Le taux de conversion est déterminé par RMN ^1H . Il est intéressant de noter qu'il est également possible de le déterminer par CES (Figure III-7).

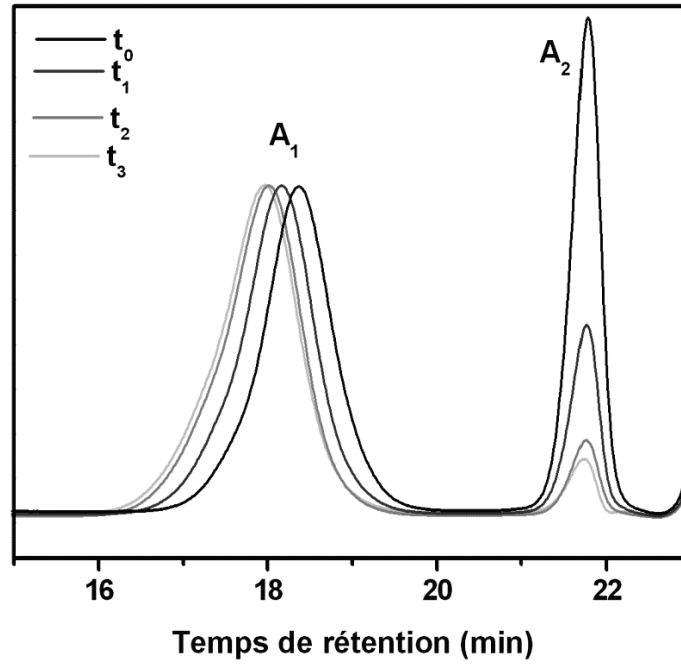


Figure III-7 CES de la polymérisation d'OEGMA₃₀₀ à différents temps de réaction

En effet, à partir de l'étude des profils CES, il est possible de déterminer l'équation 3.6 permettant de calculer un taux de conversion en monomère méthacrylate :

$$\text{Sachant que } conv = \frac{n(OEGMA)_0 - n(OEGMA)_t}{n(OEGMA)_0} \times 100$$

En définissant $A_1 = PLA + P(OEGMA)$, $A_2 = OEGMA$

On obtient $n(OEGMA)_0 = A_{1t} - (A_1 + A_2) \times \left(\frac{A_1}{A_1 + A_2}\right)_0 + A_2$ et $n(OEGMA)_t = A_2$

Il en découle l'équation 3.6 :

$$conv = \frac{A_{1t} - (A_1 + A_2) \times \left(\frac{A_1}{A_1 + A_2}\right)_0}{A_{1t} - (A_1 + A_2) \times \left(\frac{A_1}{A_1 + A_2}\right)_0 + A_2} \times 100 \quad \text{Eq. 3.6}$$

La chromatographie d'exclusion stérique du mélange réactionnel brut permet donc d'évaluer le taux de conversion et de déterminer les masses molaires (Tableau III-5).

Tableau III-5 Comparaison des conversions obtenues par RMN ^1H et CES

Temps de prélèvements	Conv _{OEGMA, RMN^a}	Conv _{OEGMA, CES^b}
min	%	%
10	28	35
20	45	43
30	54	52
40	62	63
60	70	73
90	74	81
120	78	84

Prélèvements effectués au cours de la réaction, sous flux d'argon

^a déterminé par RMN ^1H , ^b déterminé par CES selon l'équation 3.6

À partir des résultats présentés dans le Tableau III-5, il apparaît que les conversions déterminés par RMN ^1H et CES se révèlent similaires.

Cependant, du fait du caractère greffé (« brush-like ») des copolymères, la CES ne permet pas d'accéder à la masse molaire réelle. En effet, du fait de la compacité des systèmes greffés, ceux-ci présentent un volume hydrodynamique plus faible comparé à des polymères linéaires équivalents de même masse molaire. Les masses annoncées par CES sont de ce fait sous-estimées. La RMN ^1H a donc été choisie pour déterminer les masses molaires et évaluer la conversion.

L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps met en évidence une vitesse initiale de polymérisation élevée (Figure III-8) lors de la polymérisation de 25 équivalents de monomères OEGMA₃₀₀ par rapport au macroamorceur PLA(Br)₂ dans l'anisole à 60°C. Cette évolution n'est pas linéaire, ce qui montre une cinétique de consommation en monomère OEGMA irrégulière au cours du temps.

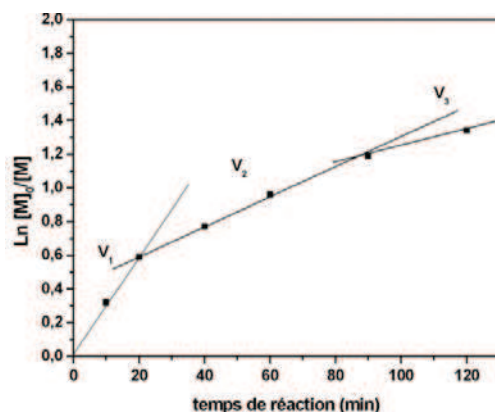


Figure III-8 Evolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour l'ATRP de l'OEGMA₃₀₀ amorcée par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales : $[OEGMA_{300}]_0 / [PLA(Br)_2]_0 / [CuBr]_0 / [PMDETA]_0 = 25 / 1 / 2 / 4$ en solution dans l'anisole à 60°C

Dans le but de contrôler le process, une quantité catalytique de cuivre sous forme Cu(II) est ajoutée au milieu réactionnel en gardant les mêmes quantités de réactifs que précédemment.³¹ Le complexe généré avec Cu(II) est connu pour diminuer la vitesse de polymérisation en se comportant comme un « désactivateur ».³² On espère ainsi avoir une vitesse de polymérisation plus homogène. Afin de le vérifier, un suivi cinétique par RMN ¹H a été réalisé sur la polymérisation de 25 équivalents de monomères OEGMA₃₀₀ par rapport au macroamorceur PLA(Br)₂ en présence de CuBr, CuBr₂ et PMDETA (Figure III-9). L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps est linéaire de premier ordre. Les réactions de terminaison susceptibles de diminuer la concentration en espèces actives sont donc négligeables. La concentration en espèces actives est ainsi constante.

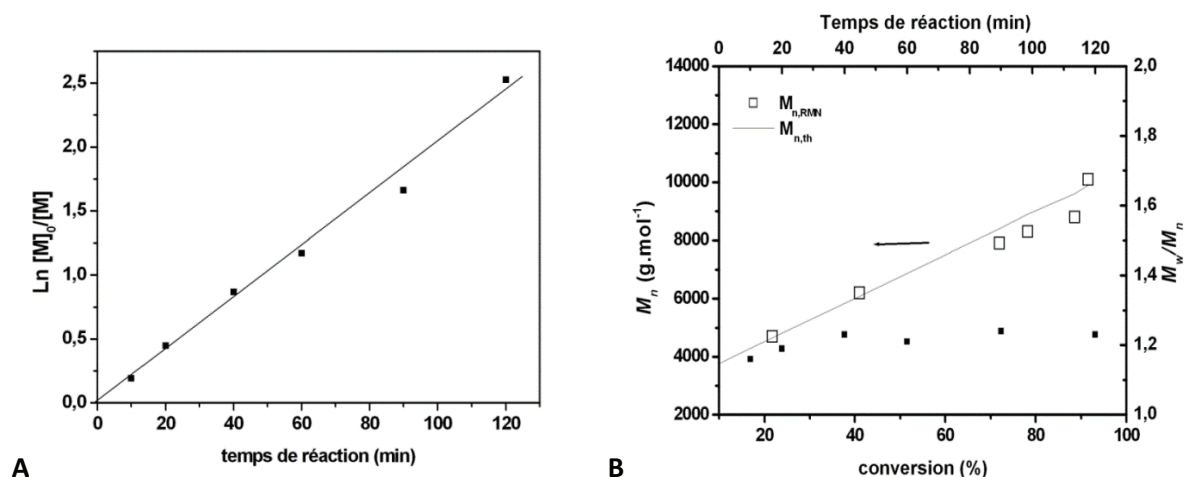


Figure III-9 Evolutions (A) de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps et

(B) de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (\bar{D}_M) en fonction de la conversion lors de l'ATRP de l'OEGMA₃₀₀ amorcée par le PLA(Br)₂.

Conditions expérimentales : $[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C.

Un suivi de l'évolution des masses molaires (M_n) et des dispersités en fonction de la conversion par RMN ^1H a également été réalisé (Figure III-9B). Une augmentation des masses molaires au cours du temps est observée, en parallèle de dispersités \mathcal{D} qui restent inférieures à 1,25 tout au long de la polymérisation (Tableau III-6, copolymères 5-1 et 5-2). Ces suivis par RMN ^1H et CES tendent à prouver le caractère contrôlé de l'ATRP dans les conditions utilisées avec un système catalytique CuBr/CuBr₂/PMDETA. Les conditions utilisées et les caractéristiques des copolymères pour les deux systèmes sont résumées dans le Tableau III-6.

Tableau III-6 Caractérisation des copolymères tribloc P(OEGMA)-*b*-PLA-*b*-P(OEGMA)

Copolymères		[OEGMA] /[PLA]	Conv ^a %	$M_{n,th}^b$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^c$ g.mol ⁻¹	[OEGMA] /[PLA] _{RMN} ^d	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	\mathcal{D}_M
Sans	4-1 ^e	25/1	87	9100	9000	20/1	14900	1,3
CuBr ₂	4-2 ^e	50/1	91	16400	15900	43/1	20000	1,4
Avec	5-1 ^f	25/1	89	9400	10500	24/1	14300	1,2
CuBr ₂	5-2 ^f	50/1	94	17000	16000	43/1	17900	1,2

Conditions : 60°C, 2 heures avec $M(\text{OEGMA}) = 300 \text{ g.mol}^{-1}$

^a déterminé par RMN ^1H ; ^b calculé selon l'équation 3.4, ^c calculé selon l'équation 3.5, ^d déterminé par RMN ^1H
^e [PLA(Br)₂]/[CuBr]/[PMDETA] = 1/2/4 et ^f [PLA(Br)₂]/[CuBr₂]/[CuBr]/[PMDETA] = 1/1/2/4

Les résultats témoignent d'une bonne corrélation entre les masses théoriques et expérimentales. Cependant, comme nous l'avons vu lors des études cinétiques, un meilleur contrôle est observé avec le système utilisant CuBr₂.

Une superposition de l'évolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps avec ou sans cuivre (II) est présenté Figure III-10 et confirme du caractère plus contrôlé lors de l'addition de CuBr₂.

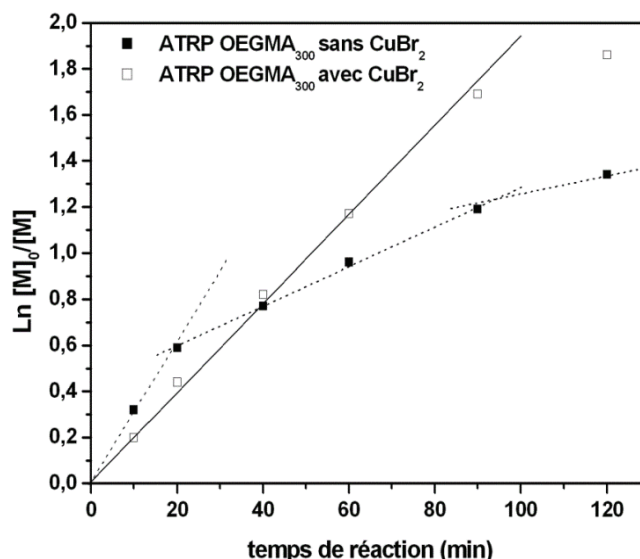


Figure III-10 Evolution des $\ln[M]_0/[M]$ en fonction du temps pour l'ATRP de l'OEGMA₃₀₀ amorcées par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales [OEGMA₃₀₀]₀/[PLA(Br)₂]₀/[CuBr]₀/[PMDETA]₀=25/1/2/4 (trait pointillé) et [OEGMA₃₀₀]₀/[PLA(Br)₂]₀/[CuBr₂]₀/[CuBr]₀/[PMDETA]₀=25/1/1/2/4 (trait plein) en solution dans l'anisole à 60°C

Il apparaît donc que la polymérisation dans l'anisole à 60°C en présence de bromure de cuivre (I), de bromure de cuivre (II) et de PMDETA, permet de contrôler le processus et l'architecture des copolymères tribloc obtenus. Les monomères méthacrylates évoqués précédemment, avec des masses molaires plus élevées (475 et 1000 g.mol⁻¹) ont donc ensuite été étudiés.

b. Etude cinétique de la polymérisation par ATRP des méthacrylates d'oligo(éthylène glycol)s OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀

L'objectif de cette partie est d'obtenir une série de copolymères tribloc à base d'un bloc central de PLA et de deux blocs constitués de branches d'oligo(éthylène glycol) hydrophiles de différentes longueurs. Une détermination systématique de la balance hydrophile/hydrophobe *B* sera réalisée. Les copolymères tribloc obtenus ici ont été synthétisés avec des méthacrylates d'oligo(éthylène glycol) de masses molaires différentes 475 et 1000 g.mol⁻¹, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀. Des études cinétiques ont été réalisées sur ces différentes synthèses. Celles-ci seront comparées à celles obtenues pour la polymérisation du monomère OEGMA₃₀₀.

Dans un premier temps, les copolymères tribloc sont préparés avec un rapport [OEGMA]/[PLA] de 25, ensuite d'autres copolymères seront préparés avec un rapport [OEGMA]/[PLA] de 50.

L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps, pour un rapport [OEGMA]/[PLA] de 25, est indiqué sur la Figure III-11. Le profil est linéaire, il démontre une consommation en monomère constante au cours du temps. Quelques remarques peuvent cependant être effectuées.

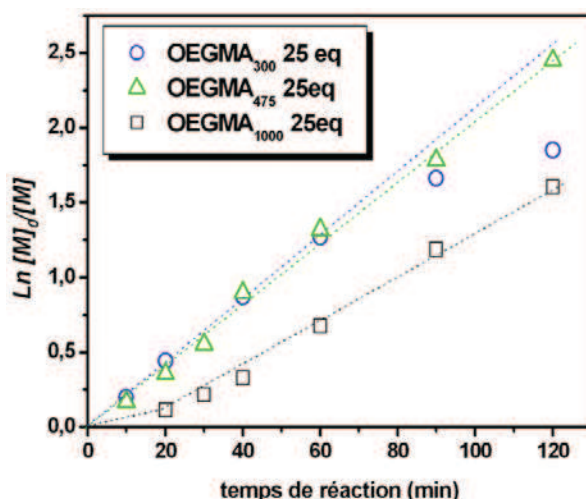


Figure III-11 Evolution de $\ln[M]_0/[M]$ en fonction du temps pour l'ATRP des OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C

Des vitesses de polymérisations similaires pour la polymérisation des monomères OEGMA₃₀₀ et OEGMA₄₇₅ sont observées. Une réactivité plus faible est observée pour le monomère de plus haute masse molaire OEGMA₁₀₀₀, en accord avec les données de la littérature.³³

L'évolution de la masse molaire déterminée par RMN ¹H ($M_{n,RMN}$) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) déterminée par CES, en fonction de la conversion en monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) est présentée Figure III-12.

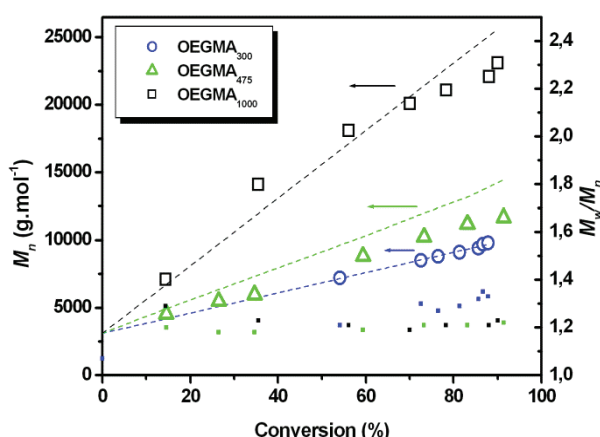


Figure III-12 Evolution de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) en fonction de la conversion pour l'ATRP des OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=25/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C

Les masses molaires expérimentales augmentent de manière linéaire avec la conversion, en adéquation avec les masses molaires théoriques (traits pointillés). Les dispersités restent faibles, inférieures à 1,4. Les études cinétiques montrent que l'on a un bon contrôle de polymérisation des monomères OEGMA de différentes masses molaires dans les conditions expérimentales utilisées.

Un suivi cinétique a également été réalisé pour un ratio $[OEGMA]/[PLA]$ de 50. L'évolution $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps est présenté Figure III-13, tandis que l'évolution de la masse molaire déterminée par RMN 1H ($M_{n,RMN}$) et de la dispersité (\bar{D}_M) déterminée par CES, en fonction de la conversion en monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA) est présentée Figure III-14.

Un comportement similaire est observé, avec une évolution linéaire de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour les monomères OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀, quoiqu'inférieure pour le monomère OEGMA₃₀₀. La concentration en radicaux se propageant reste constante durant la durée de la polymérisation.

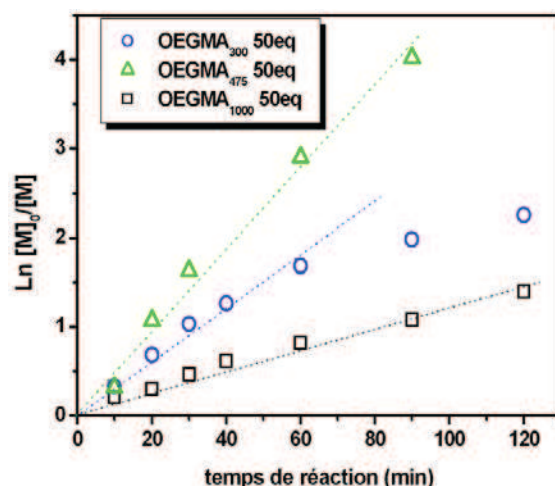


Figure III-13 Evolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps pour l'ATRP des OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDTA]_0=50/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C

Avec le monomère OEGMA₃₀₀, on observe une perte de contrôle, avec une cinétique plus lente comparée au monomère OEGMA₄₇₅. Ces résultats, non attendus, et en désaccord avec la littérature ont été tripliqués. Les différentes cinétiques effectuées révèlent toutes le même comportement avec une cinétique inférieure à celle du monomère OEGMA₄₇₅. A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'explication.

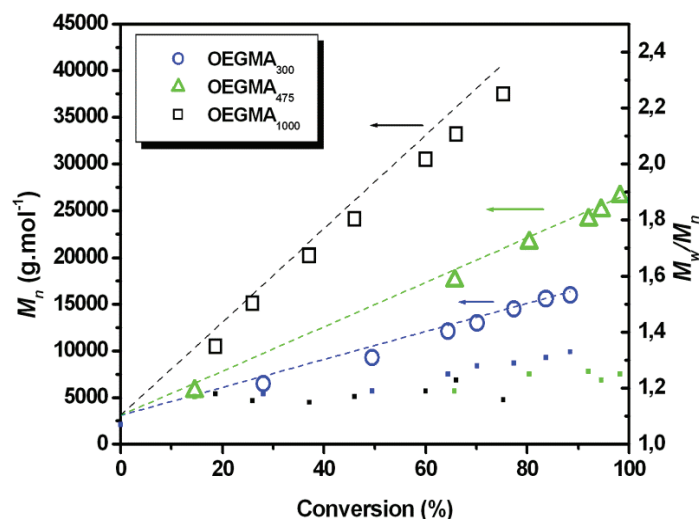


Figure III-14 Evolution de la masse molaire (M_n) et de la dispersité (D_M) en fonction de la conversion pour l'ATRP des OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀ amorcées par PLA(Br)₂

Conditions expérimentales $[OEGMA]_0/[PLA(Br)_2]_0/[CuBr_2]_0/[CuBr]_0/[PMDETA]_0=50/1/1/2/4$ en solution dans l'anisole à 60°C

La Figure III-14 montre aussi une augmentation linéaire de la masse molaire en fonction de la conversion avec une bonne corrélation avec les masses molaires théoriques (traits pointillés). Concernant l'étude de l'évolution de la dispersité (D) en fonction de la conversion, on retrouve des dispersités faibles (inférieures à 1,3) pour les monomères OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀. En revanche, une légère augmentation peut être observée en fonction de la conversion du monomère OEGMA₃₀₀, confirmant une perte de contrôle du processus.

c. Synthèse des copolymères tribloc P(OEGMA)-*b*-PLA-*b*-P(OEGMA)

Après avoir étudié les cinétiques de polymérisation des différents monomères OEGMA, une série de copolymères a été préparée, en fonction des conditions optimales de polymérisation. Chacun des copolymères est purifié sur colonne d'alumine basique et caractérisé par RMN ¹H et CES. Les caractéristiques des copolymères synthétisés sont indiquées dans le Tableau III-7. Il apparaît ainsi que chaque copolymère est obtenu avec une conversion en monomères supérieure ou égale à 75%. Une bonne corrélation entre les masses molaires expérimentales et les masses molaires théoriques, quel que soit le monomère utilisé, est observée. Les dispersités observées (D_M), restent pour l'intégralité des copolymères synthétisés, inférieures à 1,3, attestant d'un contrôle de la polymérisation.

Tableau III-7 Caractérisations des copolymères tribloc avec OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀

	$M(\text{OEGMA})$ g.mol^{-1}	$[\text{OEGMA}]/$ $[\text{PLA}]$	Temps h	Conv ^a %	$M_{n,th}^b$ g.mol^{-1}	$M_{n,RMN}^c$ g.mol^{-1}	$[\text{OEGMA}]/$ $[\text{PLA}]_{RMN}^a$	$M_{n,CES}$ g.mol^{-1}	D_M	B	f_{OEG}^e %
5-1	300	25/1	2	89	9400	10500	24/1	14300	1,2	3	68
5-2	300	50/1	2	94	17000	16000	43/1	17900	1,2	5,4	76
5-3	475	25/1	2	91	13900	14000	23/1	13800	1,3	5,2	78
5-4	475	50/1	2	97	22500	23000	42/1	17000	1,3	9,5	87
5-5	1000	25/1	2	96	26500	28000	24/1	22000	1,2	12	89
5-6	1000	50/1	4	75	39000	33000	31/1	/	/	15,5	91

Conditions : $[\text{PLA}(\text{Br})_2]/[\text{CuBr}_2]/[\text{CuBr}]/[\text{PMDETA}] = 1/1/2/4$, 60°C, 2 et 4 heures

^a déterminé par RMN ¹H ; ^b calculé selon l'équation 3.4, ^c calculé selon l'équation 3.5, ^d calculé selon l'équation 2.11, ^e calculé selon l'équation 2.12

Rappel des équations

$$B = \frac{[m \text{ motifs hydrophiles}]}{[n \text{ motifs hydrophobe}]} \quad \text{Eq. 2.11} \quad f_{OEG} = \frac{M_{hydrophile}}{M_{totale}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.12}$$

Les résultats du Tableau III-7 indiquent en plus la composition des copolymères tribloc avec la fraction molaire en unités éthylène glycol, f_{OEG} et la balance hydrophile/hydrophobe B définies dans le chapitre 2. Ceux-ci témoignent d'une augmentation considérable de la f_{OEG} en fonction de la masse molaire du monomère hydrophile et du nombre d'équivalents. Il pourra être noté que les copolymères (5-2) et (5-3), ou encore les copolymères (5-4) et (5-5) présentent la même balance hydrophobe B , et une fraction molaire f_{OEG} similaire, même si la masse molaire du monomère et le nombre d'équivalents des monomères diffèrent. L'impact de la composition sera déterminé lors de la l'étude des propriétés physico-chimiques des copolymères en milieu aqueux.

B. Synthèse de copolymères dibloc P(OEGMA)-*b*-PLA

En parallèle de la synthèse des copolymères tribloc, des copolymères dibloc ont été synthétisés en utilisant la même stratégie de synthèse et les mêmes conditions expérimentales. Ici, un macroamorceur d'ATRP monofonctionnel de PLA a été utilisé.

1. Synthèse du macroamorceur monofonctionnel ω -bromopoly(L-acide lactique)

Un poly(acide lactique) ω hydroxylé PLA(OH) portant une fonction hydroxyle en bout de chaîne a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide en solution à 80°C en utilisant un amorceur monofonctionnel, l'alcool benzylique (I) et un catalyseur métallique :l'octoate d'étain (Schéma III-6).

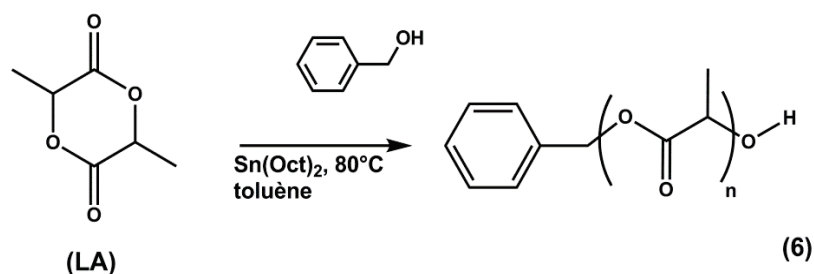


Schéma III-6 Synthèse du poly(acide lactique) ω hydroxylé PLA(OH)

Le composé (6) a été caractérisé par RMN ^1H , MALDI-TOF (Figure III-15) et CES.

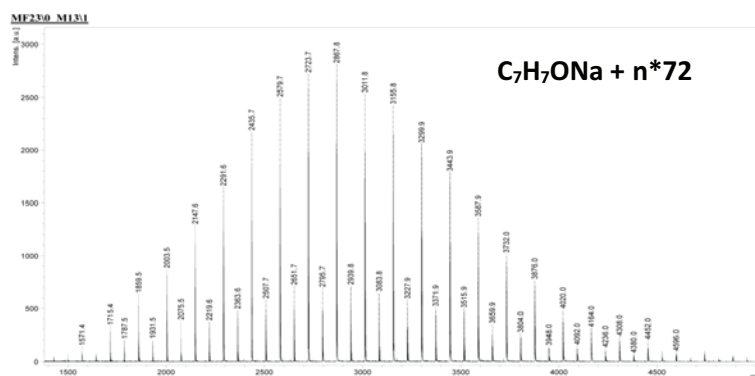


Figure III-15 Spectre MALDI-TOF du PLA(OH)

Le macroamorceur de PLA avec un site d'amorçage d'ATRP a ensuite été préparé en une étape à partir du PLA(OH). L'estérification de la fonction alcool est réalisée en milieu basique par réaction du bromure de 2-bromoisobutyryle en présence de la triéthylamine en solution dans le tétrahydrofurane à température ambiante pendant 24 heures (Schéma III-7).

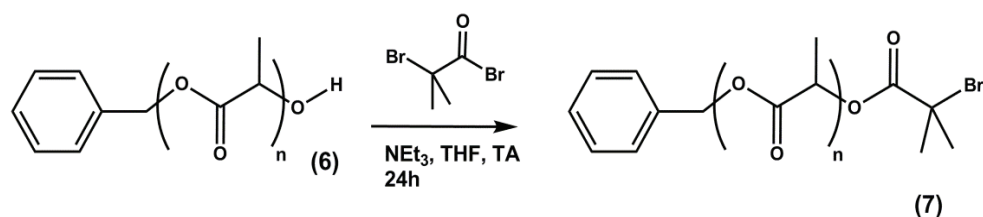


Schéma III-7 Synthèse de l' ω -bromopoly(acide lactique) PLA(Br)

Le produit (7) est également caractérisé par RMN ^1H , CES et MALDI-TOF (Figure III-16).

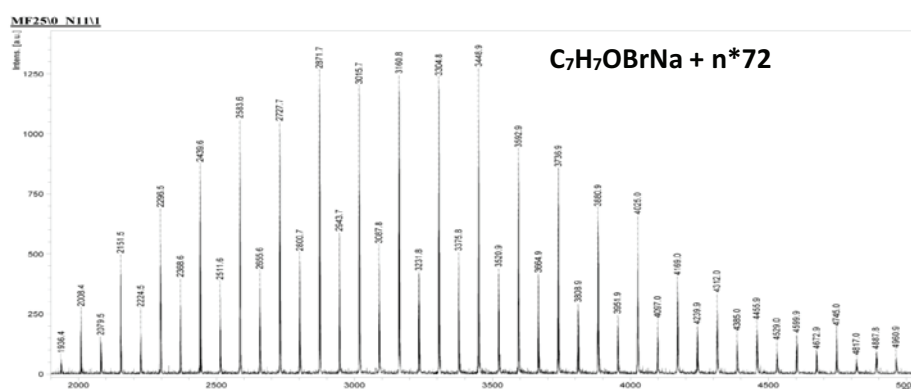


Figure III-16 Spectre MALDI-TOF du PLA(Br)

L'analyse du spectre MALDI-TOF présenté sur la Figure III-16 confirme la modification des extrémités de chaîne du bloc PLA. Les caractéristiques des deux composés sont listées dans le Tableau III-8.

Tableau III-8 Caractérisation des polymères PLA(OH) et PLA(Br)

	Conditions	Temps h	Conv LA ^c %	$M_{n,th}^d$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^e$ g.mol ⁻¹	DP _{PLA} ^c	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	\bar{D}_M
6	PLA(OH) ^a	3,5	98	3000	3600	24	4500	1,1
7	PLA(Br) ₂ ^b	24	/	3200	3900	24	4700	1,2

Conditions ^a[Sn(oct)₂]/[I]/[LA]=0,1/1/20 à 80°C dans le toluène

^b[PLA]/[NEt₃]/[BrOIBr]=1/2/2 à 25°C dans le THF

^cdéterminé par RMN ¹H, ^d calculé selon l'équation 3.1, ^e calculé selon l'équation 3.2

Les données du Tableau III-8 confirment le contrôle de la polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide avec une bonne corrélation entre la masse théorique et la masse expérimentale, avec des dispersités faibles en CES. De plus, l'analyse MALDI-TOF permet de calculer un degré de polymérisation DP en unités lactide. La fonctionnalisation s'avère quantitative avec, comme précédemment, la confirmation de l'apparition des protons méthyl à δ 1,67 ppm et l'analyse MALDI-TOF qui confirme la présence des groupements isobutyrate.

2. Synthèse de copolymères dibloc par polymérisation radicalaire de type ATRP

À partir de l'obtention et de la caractérisation du macroamorceur monofonctionnel d'ATRP, une série de copolymères dibloc a été synthétisée avec les trois différents monomères méthacrylates utilisés précédemment, OEGMA₃₀₀, OEGMA₄₇₅ et OEGMA₁₀₀₀. Le ratio monomère/macroamorceur [OEGMA]/[PLA] a été fixé à 25 équivalents (Schéma III-8).

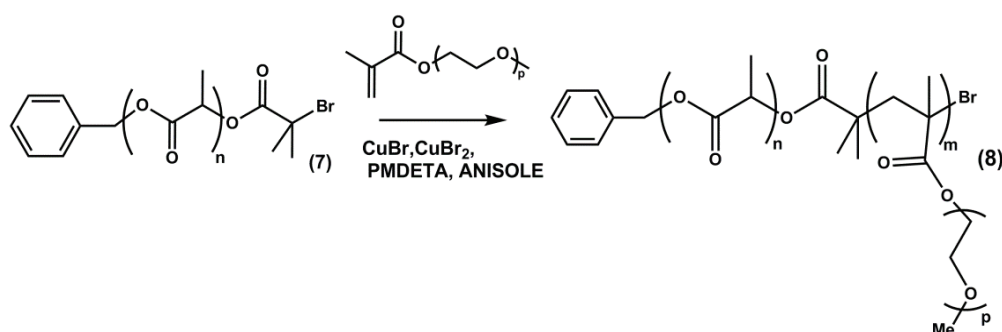


Schéma III-8 Synthèse de copolymères dibloc

Les conditions catalytiques déterminées pour la synthèse des copolymères tribloc ont été utilisées pour la synthèse de ces copolymères dibloc. Ainsi, la polymérisation radicalaire a lieu dans l'anisole

en présence de CuBr, CuBr₂ et PMDETA selon les conditions présentées dans le Tableau III-9. Les copolymères obtenus après purification sur alumine basique sont caractérisés par RMN ¹H et CES.

Tableau III-9 caractéristiques des copolymères tribloc avec OEGMA 300, 475 et 1000 g.mol⁻¹

	M(OEGMA) g.mol ⁻¹	Conv ^a %	M _{n,th} ^b g.mol ⁻¹	M _{n,RMN} ^c g.mol ⁻¹	[OEGMA]/ [PLA] _{RMN} ^a	M _{n,CES} g.mol ⁻¹	D _M	B ^d	f _{OEGMA} ^e %
8-1	300	80	9900	9800	20/1	11800	1,1	2,1	61
8-2	475	75	12800	12700	18/1	12100	1,1	3,4	67
8-3	1000	60	18900	22300	18/1	13200	1,1	7,5	82

Conditions : [PLA(Br)₂]/[CuBr₂]/[CuBr]/[PMDETA] = 1/1/2/4, 60°C, 4 heures, [OEGMA]/[PLA]=25/1

^a déterminé par RMN ¹H ; ^b calculé selon l'équation 3.4, ^c calculé selon l'équation 3.5, ^d calculé selon l'équation 2.11, ^e calculé selon l'équation 2.12

Les polymères obtenus sont préparés de manière contrôlée avec une bonne concordance entre les masses molaires théoriques et expérimentales déterminées par RMN ¹H. De plus, de faibles dispersités sont obtenues. Le Tableau III-9 révèle également que les copolymères dibloc synthétisés présentent des fractions molaires en unités hydrophiles f_{OEG} et une balance hydrophile/hydrophobe B similaires aux copolymères tribloc 5-1, 5-3 et 5-5.

L'impact de l'architecture sur les propriétés physico-chimiques des différents auto-assemblages sera étudié dans la partie suivante, en utilisant les copolymères présentés dans le Tableau III-10.

Tableau III-10 Comparaison des compositions des copolymères peigne dibloc (8-1, 8-2 et 8-3) et tribloc (5-1, 5-2 et 5-3)

Copolymères	M(OEGMA) g.mol ⁻¹	[OEGMA]/[PLA] _{RMN} ^a	M _{n,RMN} ^b g.mol ⁻¹	B ^c	f _{OEG} ^d %
5-1	300	24/1	10500	3	68
8-1	300	20/1	9800	2,1	61
5-3	475	23/1	14000	5,2	78
8-2	475	18/1	12700	3,4	67
5-5	1000	31/1	28000	12	89
8-3	1000	18/1	22300	7,5	82

^a déterminé par RMN ¹H ; ^b calculé selon l'équation 3.55, ^c calculé selon l'équation 2.11, ^d calculé selon l'équation 2.12

C. Formation de nano-objets en milieu aqueux

Les propriétés physico-chimiques en milieu aqueux des différents copolymères peigne tribloc (5-1 à 5-6) préparés par ATRP ont été étudiées pour évaluer leur potentiel en tant que systèmes de délivrance de principes actifs. Les propriétés des copolymères peigne tribloc (5-1), (5-3) et (5-5) seront comparées aux copolymères dibloc (8-1 à 8-3).

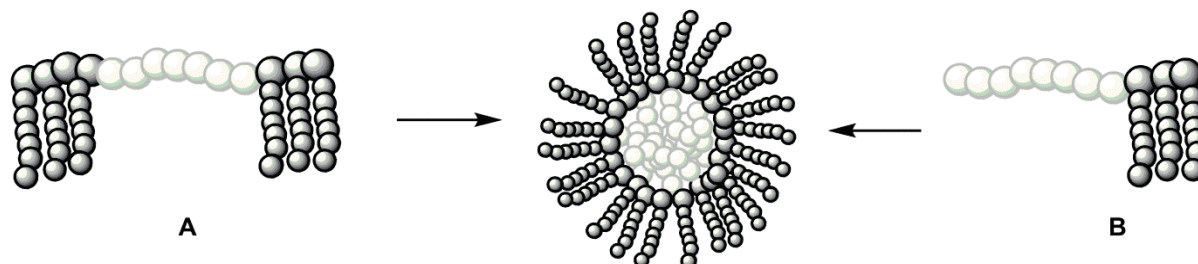


Figure III-17 (A) architecture de copolymère tribloc (B) architecture de copolymère dibloc et auto-assemblage

La dissolution directe avec agitation à l'ultraturax a été utilisée pour induire l'auto-assemblage des copolymères peigne tribloc en micelles. On s'attend à ce que les branches P(OEGMA) constituent la couronne hydrophile tandis que le bloc PLA constitue le cœur hydrophobe.

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC) par spectroscopie de fluorescence

Selon la méthodologie préalablement décrite, les expériences de fluorimétrie ont été effectuées en excitation. La longueur d'onde d'émission de (λ_{em}) a été fixée à 394 nm. Le pyrène a été utilisé comme sonde fluorescente à une concentration de 6×10^{-7} mol.L⁻¹. Conformément aux résultats observés dans le chapitre 2, une augmentation très nette dans l'intensité du spectre d'excitation du pyrène et un très léger décalage de celui-ci en parallèle de l'augmentation de la concentration en copolymère sont observés à cause du changement d'environnement du pyrène : aqueux ou hydrophobe. Le graphe du rapport des intensités 337/333, noté I_1/I_3 en fonction du logarithme de la concentration en copolymère permet de déterminer la concentration critique d'agrégation (Figure III-18). La concentration critique d'agrégation molaire est calculée à partir de la concentration critique d'agrégation déterminée graphiquement, conformément à la définition du chapitre 2.

$$CAC_m = \frac{CAC_M}{M_{copolymère}} \quad \text{Eq. 2.13}$$

Comme évoqué dans le chapitre 2, en dessous de la concentration critique d'agrégation, le rapport des intensités I_1/I_3 varie de manière négligeable tandis qu'au-delà de la concentration critique d'agrégation, le rapport augmente considérablement, correspondant à l'incorporation du pyrène dans le cœur des auto-assemblages et donc simultanément à la formation des nano-objets.

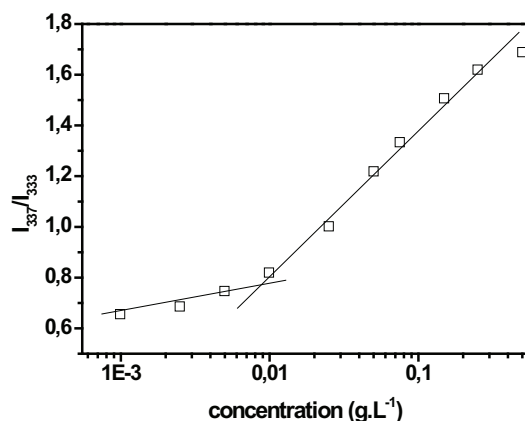


Figure III-18 Profil typique de détermination de la CAC pour les copolymères peigne tribloc

Le Tableau III-11 regroupe l'ensemble des résultats obtenus pour les six copolymères. Il apparaît que l'augmentation de la proportion en unités hydrophiles f_{OEG} contribue à faire augmenter la concentration critique d'agrégation apparente.

Tableau III-11 Détermination des concentrations critiques d'agrégation des copolymères peigne tribloc

Copolymères	M(OEGMA) g.mol ⁻¹	[OEGMA]/ [PLLA]	CAC ^a mg.L ⁻¹	CAC _m ^b μmol.L ⁻¹	B ^c	f_{OEG} ^d %
5-1	300	25/1	6,9	0,57	3	68
5-2	300	50/1	5,4	0,30	5,4	76
5-3	475	25/1	8,8	0,67	5,2	78
5-4	475	50/1	8,7	0,38	9,5	87
5-5	1000	25/1	16,9	0,90	12	89
5-6	1000	50/1	16,6	0,63	15,5	91

^a déterminé graphiquement à partir de l'intersection des deux droites, ^b calculé avec l'équation 2.13, ^c calculé avec l'équation 2.11, ^d calculé avec l'équation 2.12.

Ainsi, l'augmentation de la couche hydrophile se traduit par une déstabilisation de l'édifice, de manière similaire aux résultats observés pour les copolymères greffés étudiés dans le chapitre 2 et conformément aux données de la littérature.

Quelques nuances doivent cependant être ajoutées. Si l'on regarde les copolymères (5-1) et (5-2), il apparaît que l'augmentation de B et de f_{OEG} n'influence pas la CAC (6,9 et 5,4 respectivement). En revanche, si l'on compare les copolymères (5-2) et (5-3), présentant une balance B et un f_{OEG} similaires, la CAC apparaît supérieure pour le copolymère (5-3). Ainsi, la longueur/masse molaire des branches OEGMA influence davantage la stabilité de l'édifice formé que leur nombre. Le même phénomène est retrouvé pour les couples de copolymères (5-3/5-4), et (5-5/5-6) où le nombre de branches OEGMA n'impacte pas la stabilité de l'édifice (CAC de 8,8/8,7 et 16,9/16,6 respectivement). Tandis qu'entre les copolymères (5-4/5-5), l'augmentation de la CAC due à la longueur des branches d'OEGMA est clairement mise en évidence.

Ainsi, à partir des données du Tableau III-11 et des observations effectuées, il est possible de mettre en relief certains facteurs structuraux comme la longueur des chaînes hydrophiles et la densité de chaque bloc. Ces facteurs sont illustrés dans la Figure III-19.

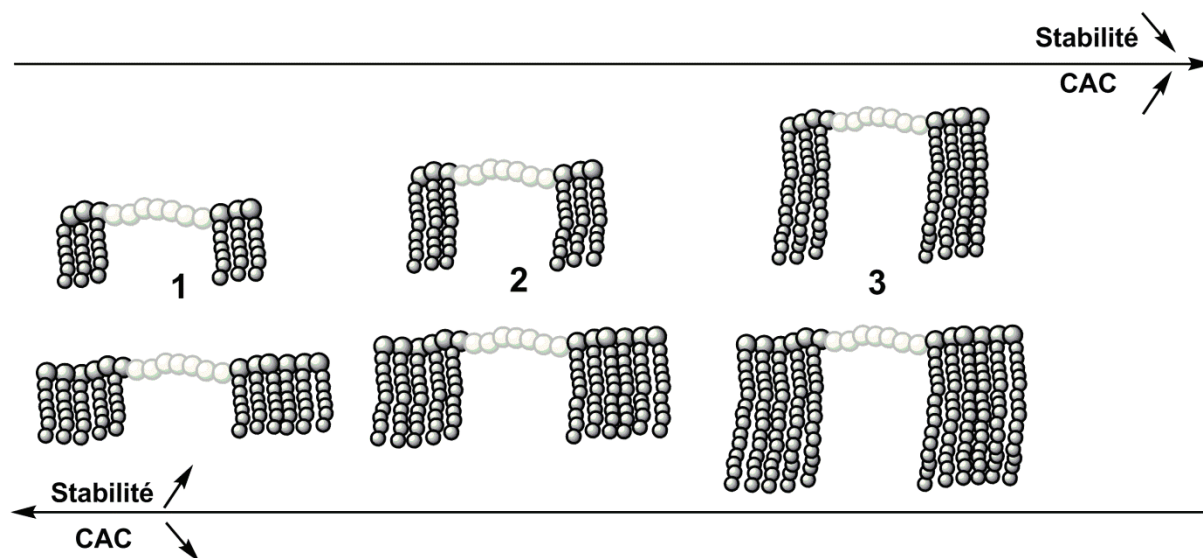


Figure III-19 Illustration de l'effet de la composition (f_{OEG} et B) et de l'architecture sur la stabilité de l'édifice et sur la concentration d'agrégation critique (CAC)

Toutes les valeurs de CAC obtenues pour ces copolymères indiquent qu'ils sont thermodynamiquement stables en milieu aqueux.

2. Détermination des diamètres et des morphologies par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie électronique à transmission (TEM)

Les diamètres des objets formés en milieu aqueux pour les copolymères tribloc ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le coefficient typique d'auto-corrélation et le profil de distribution des diamètres hydrodynamiques des objets en solution sont déterminés pour un angle de diffusion de 173° et une concentration en copolymère de 1 g.L^{-1} . La Figure III-20 montre le profil obtenu pour le copolymère peigne tribloc (5-1) (25 équivalents d'OEGMA₃₀₀).

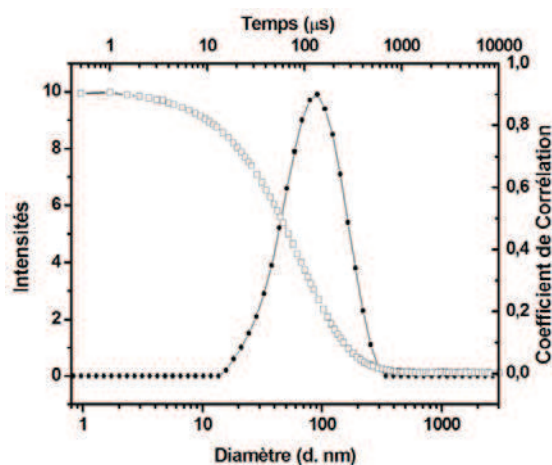


Figure III-20 Profil de distribution des tailles du copolymère 5-1, solution à 1 g.L^{-1} , $[\text{PLA}]/[\text{OEGMA}]=1/25$

Le profil est monomodal avec un diamètre de 63 nm et une faible polydispersité (0,260). L'ensemble des diamètres obtenus pour les différents copolymères tribloc est listé dans le Tableau III-12.

Tableau III-12 Diamètres des copolymères tribloc

Copolymères	M(OEGMA) g.mol^{-1}	[OEGMA]/ [PLLA]	D_H nm	Pdl
5-1	300	25/1	63	0,260
5-2	300	50/1	110	0,287
5-3	475	25/1	97	0,274
5-4	475	50/1	213	0,277
5-5	1000	25/1	56	0,351
5-6	1000	50/1	51	0,313

D'après le Tableau III-12, chaque copolymère forme des objets de diamètre inférieur à 300 nm avec de faibles dispersités. Si on se réfère aux données de la littérature et à celles obtenues dans le chapitre 2, le diamètre des nano-objets augmente avec l'augmentation de la fraction molaire en éthylène glycol f_{OEG} , gonflant ainsi la couronne hydrophile. Ceci n'est pas exact pour les copolymères (5-5) et (5-6). En effet, la Figure III-21 présente deux populations indiquant la présence simultanée de deux types de nano-objets en solution. Les valeurs du diamètre hydrodynamique observées sont donc faussées. Ainsi, deux populations sont observées avec des diamètres de 123 et 13 nm pour le copolymère (5-5) et 148 et 25 nm pour le copolymère (5-6).

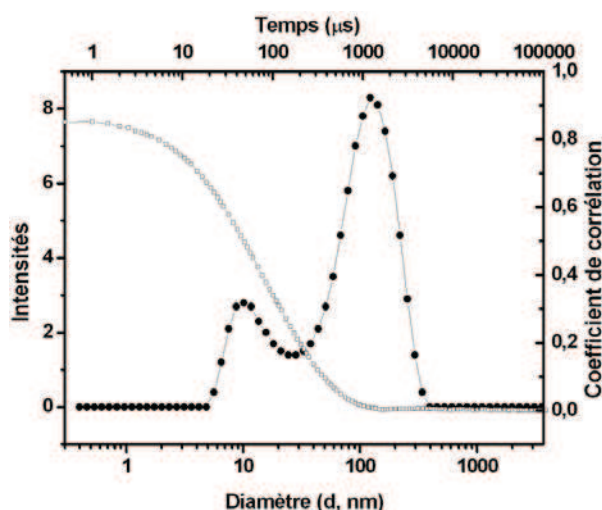


Figure III-21 Profil de distribution des tailles par DLS du copolymère 5-5 présentant 2 populations, solution à 1g.L^{-1} , $[\text{PLA}]/[\text{OEGMA}]=1/25$

Ces données peuvent s'expliquer par la présence simultanée de micelles monomacromoléculaires et de micelles polymacromoléculaires. Expérimentalement, cela peut être prouvé par le calcul du rayon du bloc PLA et du rayon des branches POEGMA. La somme des deux rayons doit permettre de retrouver le diamètre de la faible population en DLS.

Les données de la DLS ont été confirmées par microscopie électronique à transmission (TEM) qui met en évidence la morphologie des nano-objets dans leur état déshydraté.

En se plaçant à une échelle nanométrique, différentes morphologies sont observées selon la composition des copolymères. Ainsi, les copolymères (5-1) et (5-2) présentent des morphologies sphériques de type micelle dont les diamètres sont compris entre 80 et 100 nm; en adéquation avec les données obtenues en diffusion dynamique de la lumière (Figure III-22).

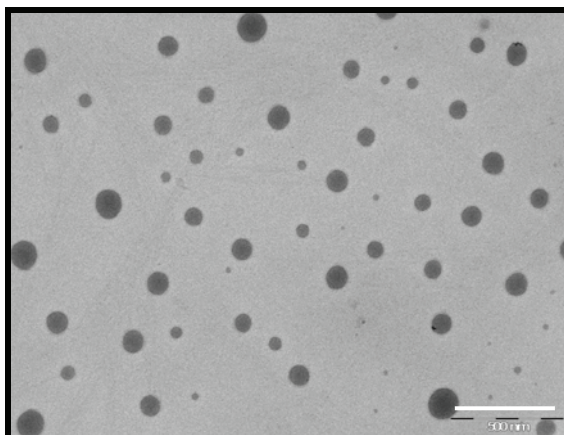


Figure III-22 Image TEM du copolymère 5-1, solution à 1g.L^{-1}

L'analyse des clichés obtenus pour le copolymère (5-3) atteste d'une structure lamellaire (Figure III-23) s'apparentant à des micelles filaments. Ici, impossible d'estimer un diamètre, cependant une largeur de 5 nm et une longueur de filament de 600 nm environ sont observées. Cette différence avec les données observées en DLS peut s'expliquer par une évaporation trop rapide de l'eau et une cristallisation des composants du polymère.

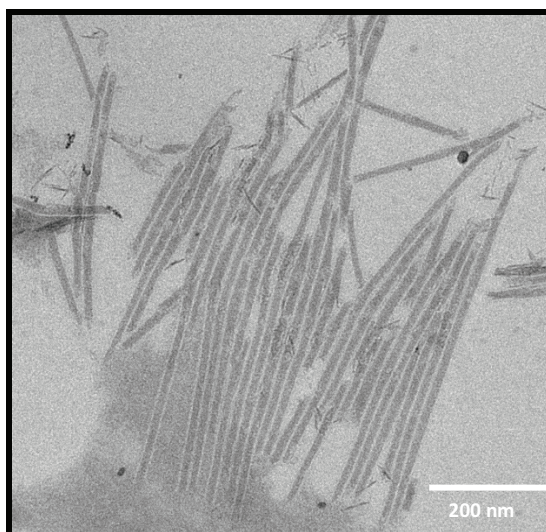


Figure III-23 Image TEM du copolymère 5-3, solution à 1g.L^{-1}

Le copolymère (5-4) fournit également des structures similaires en filament quoique plus compactes avec une largeur de filament plus épaisse.

Les copolymères (5-5) et (5-6) fournissent des clichés indiquant une morphologie sphérique, avec cependant plusieurs populations de diamètres différents. Ceci est en accord avec les données observées en DLS et l'explication fournie précédemment (Figure III-24).

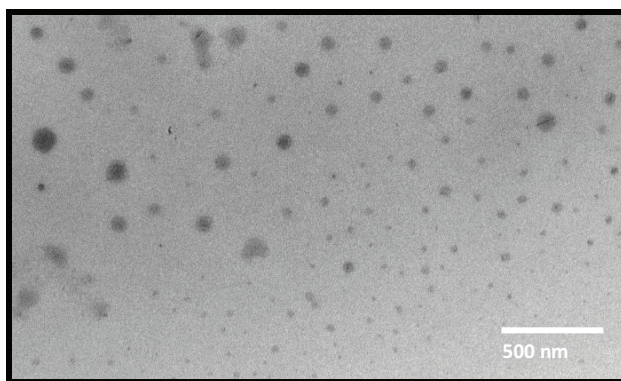


Figure III-24 Image TEM du copolymère 5-6, solution à 1g.L^{-1}

Ainsi, à partir des données récoltées, il semble que la longueur des chaînes hydrophiles influence la morphologie de l'auto-assemblage. En effet, des morphologies cylindriques sont obtenues pour les copolymères peigne tribloc avec les branches de 475 g.mol^{-1} tandis que des morphologies sphériques sont observées pour les quatre autres, avec des diamètres inférieurs à 300 nm , pour des CAC globalement faibles. Il faut également noter, que parmi ces nano-objets sphériques, les copolymères peigne tribloc possédant les plus hautes masses molaires avec les branches de 1000 g.mol^{-1} présentent une coexistence de nano-objets monomacromoléculaire et polymacromoléculaire.

Des nano-objets ont également été formés à partir des copolymères peigne dibloc par dissolution directe. Leurs propriétés physico-chimiques ont été déterminées par DLS et TEM. Les données recueillies indiquent que, quelle que soit la composition du copolymère dibloc, des morphologies sphériques sont observées avec des diamètres inférieurs à 200 nm en DLS et TEM (Figure III-25). Il peut être cependant noté que le diamètre des nano-objets augmente avec l'augmentation de la proportion d'unités éthylène glycol f_{OEG} .

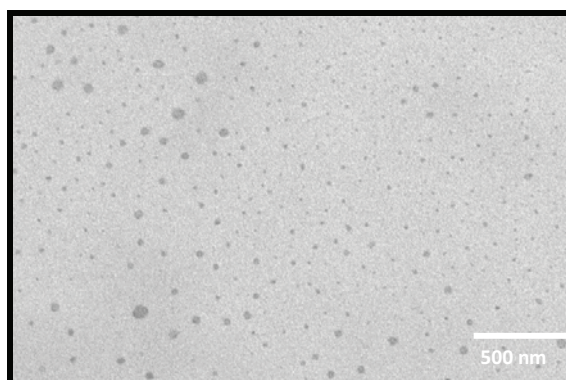


Figure III-25 Illustration des objets sphériques obtenus pour les copolymères dibloc par TEM

Si l'on compare les propriétés physico-chimiques des nano-objets obtenus, il apparaît que la présence des blocs peigne hydrophiles et la variation de la longueur des branches de chaque côté du

bloc central hydrophobe influence davantage l'auto-assemblage. En effet, on assiste à une modification de la morphologie et de la taille des nano-objets en solution (cylindriques, sphériques monomacromoléculaires ou plurimacromoléculaires) alors qu'une simple augmentation du diamètre des nano-objets sphériques est observée pour les copolymères peigne dibloc.

D. Encapsulation et cinétique de libération de principes actifs

Les propriétés physico-chimiques des différents copolymères ayant été déterminées, leur capacité à encapsuler des principes actifs hydrophobes et à les libérer a été testée.

1. Encapsulation de la curcumine

Conformément au chapitre 2, les tests d'encapsulation ont été réalisés sur la curcumine pour les raisons évoquées précédemment, à savoir sa faible hydrosolubilité ($11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ soit $0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et ses propriétés anti-inflammatoires ou anti-cancéreuses parmi d'autres. Nous avons mis en évidence dans le chapitre 2 que la méthode de « film-casting » serait plus judicieuse que la nanopréciipitation pour l'encapsulation de PA. Nous avons donc testé l'encapsulation de principes actifs par la méthode du « film-casting ».

La méthode du « film-casting » diffère de la dissolution directe dans l'étape de dissolution du copolymère avec le PA (Figure III-26).

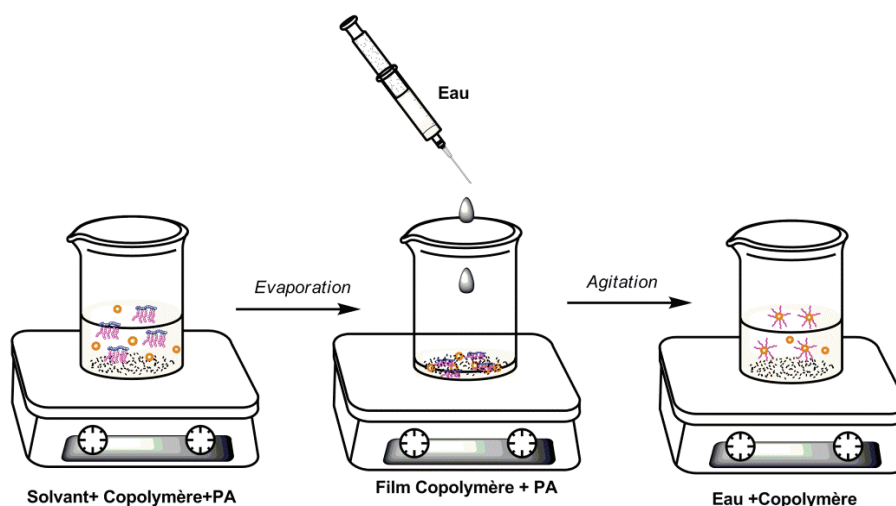


Figure III-26 Principe de la méthodologie de "film-casting"

Celle-ci a lieu dans un solvant organique, l'acétone. Le film est préparé, après dissolution des deux espèces, par évaporation de l'acétone à l'évaporateur rotatif. L'eau est ensuite ajoutée lentement sous faible agitation jusqu'à dissolution du film. Cette méthode permet de faciliter l'incorporation de la curcumine dans le cœur des nano-objets.³⁴ Les solutions contenant le polymère et le principe actif encapsulé sont centrifugées et le surnageant est récupéré. La Figure III-27 illustre le phénomène d'encapsulation de la curcumine par le copolymère. En solution aqueuse, la curcumine est insoluble (tube témoin F) et précipite. Dans une solution aqueuse du copolymère à une concentration supérieure à la concentration critique d'agrégation (1 g.L^{-1}), une coloration homogène est observée, preuve de la solubilisation de la curcumine (A à E). Conformément au phénomène évoqué précédemment, les tubes C et D présentent une coloration plus intense.

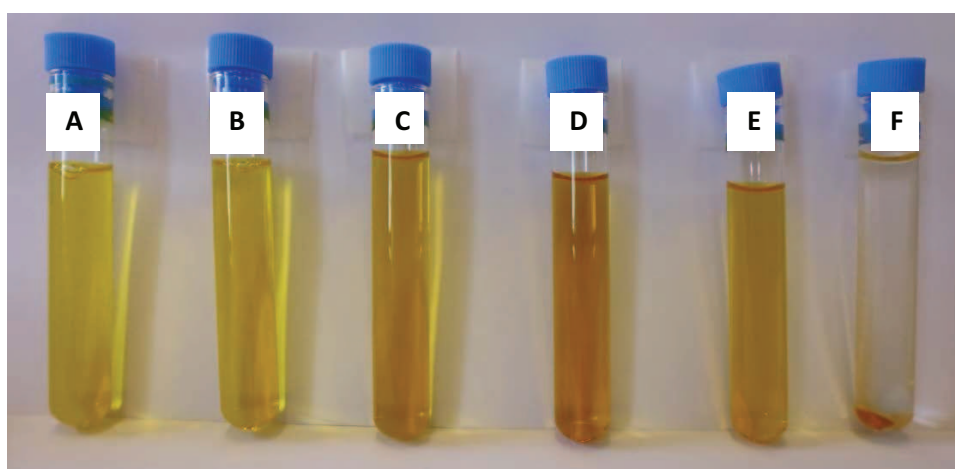


Figure III-27 Encapsulation de curcumine (A) à (E) solutions homogènes de copolymères avec la Curcumine (F) Tube témoin avec la curcumine dans l'eau

Une couleur orangée homogène est observée à l'incorporation de la curcumine dans le cœur hydrophobe de PLA des nano-objets formés.

L'incorporation en curcumine dans les différentes solutions a été mesurée par spectroscopie UV. Une courbe de calibration UV a été réalisée en préparant une gamme de solutions de concentrations variable en curcumine dans un mélange acétone/eau (4/1), et en se plaçant à une longueur d'onde λ de 425 nm. L'acquisition des différents spectres a permis de tracer la droite d'étalonnage, et de déterminer ainsi le coefficient d'extinction molaire ϵ , égal ici à $56165 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Figure III-28). Le mélange utilisé pour réaliser la courbe de calibration permet une détection immédiate de la quantité de curcumine encapsulée dans les solutions sans avoir besoin de lyophiliser la solution au préalable.

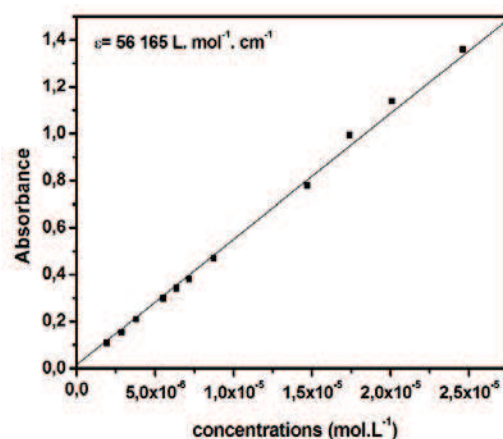


Figure III-28 Courbe de calibration de la curcumine, $\lambda=425\text{nm}$

Les résultats obtenus pour les encapsulations dans les copolymères (5-1) à (5-6) sont listés dans le Tableau III-13.

Tableau III-13 Encapsulation de la curcumine avec les systèmes peigne tribloc

Copolymères	$n_{\text{cur,enc}}$ μmol	$m_{\text{cur,enc}}$ mg	n_{copo} μmol	EE^a %	DL_M^b %	DL_m^c %
5-1	6,3	2,3	4,6	23	3,8	57,6
5-2	7,2	2,7	3,5	27	4,4	67,2
5-3	9,4	3,5	3,6	34	5,9	72,5
5-4	5,1	1,9	2,2	19	3,1	70
5-5	5,5	2	1,8	20	3,4	75,3
5-6	3,4	1,2	1,5	12	2,1	69,1

Conditions : 10 mg de curcumine avec 50 mg de copolymère ^a calculé avec l'équation 2.14, ^b calculé avec l'équation 2.15, ^c calculé avec l'équation 2.16

Rappel des équations définies dans le chapitre 2 :

$$EE = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,initial}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.14}$$

$$DL_M = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,enc} + m_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.15}$$

$$DL_m = \frac{n_{PA,enc}}{n_{PA,enc} + n_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.16}$$

Les efficacités d'encapsulation (*EE*) indiquées dans le Tableau III-13 sont comprises entre 10 et 40 % selon les copolymères. La tendance globale indique que l'encapsulation diminue avec l'augmentation de la balance hydrophile/hydrophobe *B* des copolymères. Une exception à cette tendance peut être relevée avec le copolymère (5-3) qui présentait, en TEM, une morphologie lamellaire ou cylindrique. Il a déjà été relevé dans la littérature que de telles morphologies présentent un avantage considérable concernant le taux d'encapsulation, en parallèle d'une circulation prolongée dans l'organisme.^{35,36} Les copolymères tribloc (5-5) et (5-6), qui présentaient en DLS et en TEM plusieurs populations sphériques dont certaines avec un faible diamètre (15 nm) affichent les efficacités d'encapsulation (*EE*) et taux de charge (*DL*) les plus faibles. Vraisemblablement, les populations avec les diamètres compris entre 20 et 200 nm ne sont pas en mesure de solubiliser une plus grande quantité de curcumine. La masse molaire de ces copolymères est certes supérieure aux autres, mais la proportion d'unités hydrophobes reste la même, formant un cœur PLA peu accessible. Les valeurs obtenues pour les taux de charge (*DL*) sont en accord avec les données présentées dans la littérature. Song *et al.* relatent par exemple la synthèse d'un copolymère tribloc PLGA-*b*-PEG-*b*-PLGA, dont le segment central est hydrophile et les branches hydrophobes.³⁷ Leurs études démontrent un taux d'encapsulation maximal de 6%, similaire au taux pour le copolymère (5-3). Si l'on compare ces valeurs à celles obtenues pour les systèmes à base de copolymère greffé du chapitre 2, on relèvera des taux d'encapsulation équivalents ou supérieurs (rappel : *DL*=3% pour l'encapsulation de la curcumine par le copolymère (11-3) par dissolution directe, *B*=1,9, *f*_{OEG}=53%)

2. Etude comparative avec des systèmes à base de copolymères dibloc

À partir de ces copolymères, témoignant d'une solubilité de la curcumine multipliée par un facteur de 63 000, des études comparatives ont été effectuées avec les copolymères dibloc synthétisés et caractérisés précédemment. Les résultats des encapsulations sont indiqués dans le Tableau III-14.

Tableau III-14 Encapsulation de la curcumine avec les systèmes peigne dibloc

Copolymères dibloc	<i>n</i> _{cur,enc} μmol	<i>m</i> _{cur,enc} mg	<i>n</i> _{copo} μmol	<i>EE</i> ^a %	<i>DL</i> _M ^b %	<i>DL</i> _m ^c %
8-1	12,2	4,5	5,1	45	7,5	70,5
8-2	6,4	2,4	3,9	23	3,9	62,1
8-3	5,1	1,9	2,24	18	3,1	69,5

Conditions : 10 mg de curcumine avec 50 mg de copolymère

^a calculé avec l'équation 2.14, ^b calculé avec l'équation 2.15, ^c calculé avec l'équation 2.16

Le Tableau III-14 affiche un taux d'encapsulation (DL) et une efficacité d'encapsulation (EE) qui décroît lorsque la masse molaire du copolymère et la balance B augmentent. Cette tendance confirme l'hypothèse selon laquelle, plus la fraction molaire en unités OEGMA f_{OEG} augmente, plus l'efficacité d'encapsulation diminue. Une autre remarque qui peut être effectuée concerne le copolymère (15-2), de composition analogue au copolymère (5-3). En effet, celui-ci ne présente pas un taux d'encapsulation (DL) plus élevé. Cela s'explique par la morphologie qu'adopte l'auto-assemblage en milieu aqueux, dans ce cas sphérique au lieu de tubulaire. Enfin, il peut être noté que le taux d'encapsulation (DL) de la curcumine dans les copolymères peigne dibloc apparaît sensiblement similaire, quoique légèrement supérieur aux valeurs retrouvées pour les copolymères peigne tribloc. Cette légère différence peut être expliquée par la structure des copolymères. En effet, la structure dibloc facilite l'incorporation de la curcumine et son accès au cœur hydrophobe de l'auto-assemblage tandis que la structure tribloc où le segment central du copolymère tribloc est hydrophobe, contraint l'auto-assemblage et rend le cœur plus compact.

À partir de l'ensemble des résultats obtenus, des études préliminaires de cinétiques de libération de la curcumine ont été effectuées sur les systèmes peigne tribloc.

3. Etudes préliminaires de libération de la curcumine

L'évaluation de la libération de la curcumine *in vitro* à partir des nano-objets a été un défi car la curcumine possède une très faible hydrosolubilité et une grande instabilité. À partir de données de la littérature, il a été décidé d'ajouter 0,5% (w/v) de Tween 80 dans le tampon phosphate (PBS) pour se placer en conditions dites « sink » et faciliter la solubilisation de la curcumine libérée des systèmes polymères.³⁸

Dans un premier temps, les copolymères peigne tribloc 5-1 à 5-4 ont été utilisés pour encapsuler la curcumine par la méthode « film-casting » dans une solution aqueuse contenant le tampon phosphate (PBS). Une nouvelle courbe de calibration UV a été mise en place en préparant une gamme de solutions de concentrations variables en curcumine (Figure III-29) dans du PBS, contenant 0,5% (w/v) de Tween 80, en se plaçant à une longueur d'onde λ de 425 nm. L'acquisition des différents spectres a permis de tracer la droite présentée sur la Figure III-29, et de déterminer le coefficient d'extinction molaire ϵ , égal ici à 38472 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

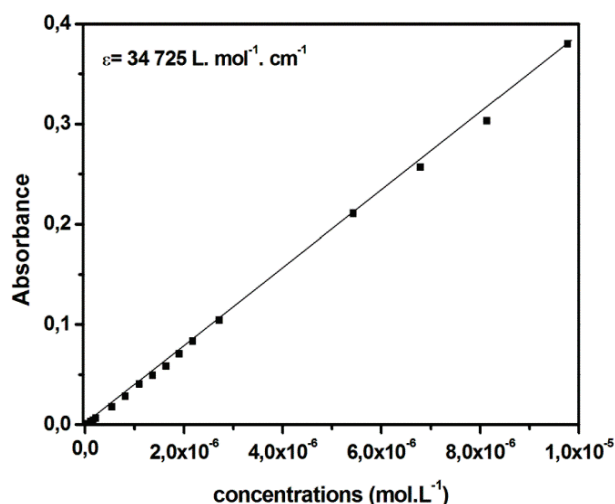


Figure III-29 Courbe de calibration de la curcumine déterminée dans une solution de PBS contenant 0,5% de Tween 80 (w/v), $\lambda=425$ nm

La teneur initiale en curcumine initiale dans les différentes solutions contenant le copolymère et la curcumine est évaluée par spectroscopie UV. Ensuite, chacune de ces solutions a été introduite dans des boyaux de dialyse (MWCO 3500 Da), eux-mêmes introduits dans des piluliers contenant du PBS et 0,5% (w/v) de Tween 80 (Figure III-30).



Figure III-30 Libération typique à partir d'un boyau de dialyse (MWCO 3500 g.mol⁻¹) dans du PBS et du Tween 80

La libération de la curcumine à partir des 4 copolymères a été évaluée à 37°C sur plus de 15 jours. Le milieu extérieur, dans lequel est plongé le boyau de dialyse, a été prélevé et remplacé à intervalles réguliers. La quantité de curcumine dans le milieu prélevé est directement quantifiée par analyse UV.

Les résultats obtenus pour les cinétiques de libération des copolymères tribloc (5-1) à (5-4) sont listés dans le Tableau III-15 et illustrés par la Figure III-31. Des prélèvements effectués toutes les heures pendant les 8 premières heures ont confirmé l'absence d'un « effet burst » ou libération trop rapide de curcumine.

Le Tableau III-15 affiche le taux de curcumine relargué (en pourcentage) en fonction du temps et sous une forme cumulative. Il apparaît qu'au bout de 15 jours, au maximum 35 % de la curcumine initialement encapsulée ont été libérés.

Tableau III-15 Cinétique de libération de la curcumine en pourcentage des systèmes 5-1 à 5-4 en fonction du temps

Copolymères + Curcumine	Temps (jours)							
	0,33	1	2	4	6	8	10	15
5-1	5	15,2	17,2	17,7	18,8	20,7	22,3	23,5
5-2	2,4	12,8	18,2	18,5	19,4	20,4	21,2	21,7
5-3	3,3	16,4	27,1	30,6	33,3	34,5	34,9	35,1
5-4	6,3	18,2	21,4	22,5	23,2	24,2	25,2	26,7

Conditions : copolymère 5-1 à 5-4 encapsulant de la curcumine par la méthode de « film-casting »

Une cinétique de libération plus importante est notée pour le copolymère (5-3), possédant la quantité de curcumine initiale la plus importante. Les trois autres copolymères présentent des cinétiques de libération sensiblement similaires. Dans les quatre cas, on constatera une sorte de plateau qui apparaît au bout de 4 à 5 jours. Ces données sont illustrées Figure III-31.

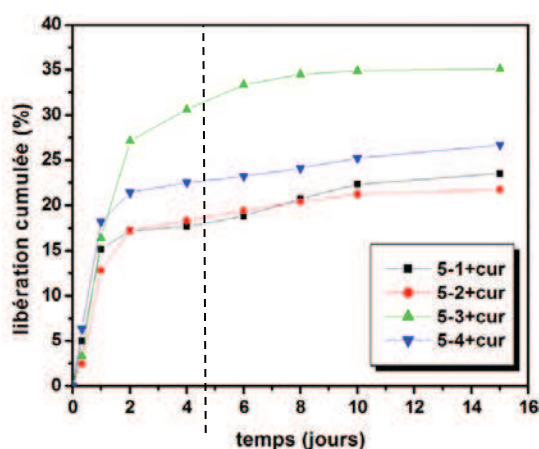


Figure III-31 Profil de libération de la curcumine à partir des copolymères (5-1) à (5-4) en fonction du temps

Ce plateau peut s'expliquer par la nature instable de la curcumine qui une fois libérée du système polymérique s'oxyde et se dégrade.³⁹ Cela a été confirmé par une évaluation de la présence de curcumine dans le contenu du tube de dialyse. En effet, aucun signal correspondant au spectre de la curcumine n'a été observé. Ainsi, à partir de 5 jours la structure de la curcumine est modifiée et dégradée, faussant le spectre d'absorption UV. La mesure UV du milieu extérieur mesure précisément seulement la quantité de curcumine encore sous sa forme originelle, et non les autres espèces dégradées. D'autres équipes ont fait face aux mêmes problèmes, puisque Shahani *et al.* constatent une dégradation de plus de 60% en 5 jours de la quantité initialement présente de curcumine.⁴⁰ Au vu de la littérature, il semble que cette instabilité peut être modulée par l'ajout de molécules anti-oxydantes comme l'acide ascorbique, ou encore la N-acétyl-L-cystéine, permettant de conserver l'intégrité de la structure moléculaire.

Conclusion

Dans ce chapitre, des copolymères peigne tribloc amphiphiles avec deux blocs poly(oligo(éthylène) méthacrylate) (P(OEGMA)) reliés à un bloc central hydrophobe de poly(L-acide lactique) (PLA) ont été préparés de manière contrôlée par une combinaison de polymérisation par ouverture de cycle et polymérisation radicalaire contrôlée. Les conditions optimales de polymérisation radicalaire ont été déterminées. Les copolymères de type peigne obtenus ont été caractérisés par RMN ¹H, CES et RMN DOSY, confirmant la synthèse de copolymères peigne à blocs parfaitement définis. En parallèle, des copolymères peigne dibloc constitués d'un bloc hydrophobe de poly(L-acide lactique) (PLA) et d'un bloc de poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol)) (P(OEGMA)) hydrophile ont également été synthétisés et caractérisés en utilisant les mêmes méthodes.

Les propriétés en milieu aqueux de chacun de ces copolymères ont été déterminées par spectroscopie de fluorescence, diffusion dynamique de la lumière, et microscopie électronique à transmission. Les résultats obtenus suggèrent que la composition, la structure dibloc ou tribloc, la longueur des branches hydrophiles et la balance hydrophobe/ hydrophile sont des facteurs qui influencent la formation de nano-objets de types micelles polymériques sphériques et cylindriques en milieu aqueux.

La capacité des différents copolymères à encapsuler la curcumine a été évaluée, et les systèmes ont été comparés. Des valeurs d'encapsulation similaires ont été observées, semblant diminuer en fonction de l'augmentation de l'hydrophilie du système polymère. Des essais préliminaires ont été

réalisés sur la libération de curcumine à partir des systèmes peigne tribloc. Les résultats indiquent que, non seulement les copolymères permettent l'encapsulation et la solubilisation de ce principe actif, mais qu'ils permettent une libération contrôlée sans « effet burst » sur les premiers jours. Cependant, à cause d'une dégradation prématurée du PA en dehors des systèmes polymères il n'a pas été possible de déterminer un profil de libération sur une durée plus longue.

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que les copolymères peigne tribloc à base de PLA et de PEG synthétisés sont des candidats prometteurs pour le transport de molécules hydrophobes, comme leurs homologues dibloc.

E. Bibliographie

1. Du, J.-Z., Tang, L.-Y., Song, W.-J., Shi, Y., Wang, J. Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) side chains as drug carrier. *Biomacromolecules* **10**, 2169–2174 (2009).
2. Abulateefeh, S. R., Saeed, A. O., Aylott, J. W., Chan, W. C., Garnett, M. C., Saunders, B. R., Alexander, C.. Facile synthesis of responsive nanoparticles with reversible, tunable and rapid thermal transitions from biocompatible constituents. *Chem. Commun.* 6068–6070 (2009).
3. Saeed, A. O., Dey, S., Howdle, S. M., Thurecht, K. J. Alexander, C. One-pot controlled synthesis of biodegradable and biocompatible co-polymer micelles. *J. Mater. Chem.* **19**, 4529 (2009).
4. Lee, H. Lee, E., Kim, D. K., Jang, N. K., Jeong, Y. Y., Jon, S. Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7383–7389 (2006).
5. Tao, L., Mantovani, G., Lecolley, F. Haddleton, D. M. Alpha-aldehyde terminally functional methacrylic polymers from living radical polymerization: application in protein conjugation "pegylation". *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13220–13221 (2004).
6. Jones, M. C., Ranger, M., Leroux, J. C. pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: Synthesis of a novel drug carrier. *Bioconjug. Chem.* **14**, 774–781 (2003).
7. He, W., Benson, R. *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices. Handb. Polym. Appl. Med. Med. Devices* 55–76 (2014).
8. Edmondson, S. Vo, C., Armes, S. P. Surface polymerization from planar surfaces by atom transfer radical polymerization using polyelectrolytic macroinitiators. *Macromolecules* **40**, 5271–5278 (2007).
9. Wang, X.-S., Armes, S. P. Facile atom transfer radical polymerization of methoxy-capped oligo(ethylene glycol) methacrylate in aqueous media at ambient temperature. *Macromolecules* **33**, 6640–6647 (2000).
10. Wang, X.-S., Lascelles, S. F., Jackson, R. a., Armes, S. P. Facile synthesis of well-defined water-soluble polymers via atom transfer radical polymerization in aqueous media at ambient temperature. *Chem. Commun.* 1817–1818 (1999).
11. Liu, B., Kazlauciunas, A., Guthrie, J. T., Perrier, S. One-pot hyperbranched polymer synthesis mediated by reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Macromolecules* **38**, 2131–2136 (2005).
12. Fernandez-trillo, F. Duréault, A., Bayley, J. P. M., Hest, L. C. M. V., Thies, J. C., Michon, T., Weberskirch, R., Cameron, N. R. Elastin-based side-chain polymers : Improved synthesis via RAFT and stimulus responsive behavior. *Macromolecules* **40**, 6094–6099 (2007).

13. Colombani, D. Chain-growth control in free radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **22**, 1649–1720 (1997).
14. Matyjaszewski, K. Controlled radical polymerization. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **685**, 769–776 (1998).
15. Nicolas, J. Guillaneuf, Y., Lefay, C., Bertin, D., Gimes, D., Charleux, B.. Nitroxide-mediated polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 63–235 (2013).
16. Ohno, K., Izu, Y., Tsujii, Y., Fukuda, T., Kitano, H. Some aspects of nitroxide-mediated living radical polymerization of N-(p-vinylbenzyl)phthalimide. *Eur. Polym. J.* **40**, 81–88 (2004).
17. Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M., Higashimuras, T. Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon. *Macromolecules* **28**, 1721–1723 (1996).
18. Wang, J., Matyjaszewski, K. Controlled/“living” radical polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5614–5615 (1995).
19. Wager, C. M., Haddleton, D. M., Bon, S. a. . A simple method to convert atom transfer radical polymerization (ATRP) initiators into reversible addition fragmentation chain-transfer (RAFT) mediators. *Eur. Polym. J.* **40**, 641–645 (2004).
20. Oh, J. K., Min, K., Matyjaszewski, K. Preparation of poly(oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate) by homogeneous aqueous AGET ATRP. *Macromolecules* **39**, 3161–3167 (2006).
21. Hussain, H., Mya, K. Y., He, C. B. Self-assembly of brush-like poly[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate] synthesized via aqueous Atom Transfer Radical Polymerization. *Langmuir* **24**, 13279–13286 (2008).
22. Forbes, D. C., Creixell, M., Frizzell, H., Peppas, N. a. Polycationic nanoparticles synthesized using ARGET ATRP for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**, 472–478 (2013).
23. Forbes, D. C., Peppas, N. A. Differences in molecular structure in cross-linked polycationic nanoparticles synthesized using ARGET ATRP or UV-initiated polymerization. *Polymer* . **54**, 4486–4492 (2013).
24. Choochottiros, C., Park, E., Chin, I. J. Synthesis and characterization of polylactide-poly(methyl methacrylate) copolymer by combining of ROP and AGET ATRP. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**, 993–1000 (2012).
25. McCormick, C. L., Lowe, A. B. Aqueous RAFT polymerization: recent developments in synthesis of functional water-soluble (co)polymers with controlled structures. *Acc. Chem. Res.* **37**, 312–325 (2004).
26. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H. Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer* . **49**, 1079–1131 (2008).
27. Moad, G., Chong, Y. K., Postma, A., Rizzardo, E., Thang, S. H. Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups. *Polymer* . **46**, 8458–8468 (2005).

28. Gregory, A., Stenzel, M. H. Complex polymer architectures via RAFT polymerization: From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 38–105 (2012).
29. Bakkour, Y., Darcos, V., Li, S., Coudane, J. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as a powerful tool for amphiphilic block copolymer characterization and for critical micelle concentration. *Polym. Chem.* **3**, 2006–2010 (2012).
30. Guillaume, S. M., Soum, A. Polymerization of ϵ -caprolactone initiated by $\text{Nd}(\text{BH}_4)_3(\text{THF})_3$: Synthesis of hydroxytelechelic poly(ϵ -caprolactone). *Macromol. Symp.* **3**, 54–60 (2003).
31. Kizhakkedathu, J. N., Kumar, K. R., Goodman, D., Brooks, D. E. Synthesis and characterization of well-defined hydrophilic block copolymer brushes by aqueous ATRP. *Polymer* . **45**, 7471–7489 (2004).
32. Braunecker, W. A., Matyjaszewski, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 93–146 (2007).
33. Roos, S. G., Mu, A. H. E. Copolymerization of n -butyl acrylate with methyl methacrylate and PMMA macromonomers : comparison of reactivity ratios in conventional and Atom Transfer Radical Copolymerization. *Macromolecules* **32**, 8331–8335 (1999).
34. Zhang, K. Tang, X., Zhang, J., Lu, W., Lin, X., Zhang, Y., Tian, B., Yang, H., He, H.. PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug delivery applications. *J. Control. Release* **183**, 77–86 (2014).
35. Yang, J. Viscoelastic wormlike micelles and their applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 276–281 (2002).
36. Zhou, Z., Chaibundit, C., D'Emanuele, A., Lennon, K., Attwood, D., Booth, C. , Solubilisation of drugs in worm-like micelles of block copolymers of ethylene oxide and 1,2-butylene oxide in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **354**, 82–87 (2008).
37. Song, Z., Feng, R., Sun, M., Guo, C., Gao, Y., Li, L., Zhai, G.. Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *J. Colloid Interface Sci.* **354**, 116–123 (2011).
38. Song, L., Shen, Y., Hou, J., Lei, L., Guo, S., Qian, C.. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **390**, 25–32 (2011).
39. Mohanty, C., Sahoo, S. K. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials* **31**, 6597–6611 (2010).
40. Shahani, K., Panyam, J. Pharmaceuticals, preformulation and drug delivery high loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 2599–2609 (2011).

Chapitre IV : Synthèse de copolymères amphiphiles et fonctionnalisation pour moduler l'efficacité des principes actifs *in vivo*

Introduction

L'immunisation médiée par les cellules est une voie permettant de développer l'immunothérapie par l'intermédiaire d'antigènes associés aux cancers. Cette immunothérapie peut être effective grâce à la stratégie d'adjuvantation qui permet de manipuler le système immunitaire et renforcer sa réponse. Parmi les adjuvants utilisés actuellement pour délivrer des principes actifs comme les vaccins, les MF59 et AS03 sont actuellement en essais cliniques sous formes d'émulsions d'huile dans l'eau (O/W).¹⁻⁴ Ces deux systèmes utilisent le squalène pour constituer le cœur et du Tween 80 comme émulsifiant. Cependant, l'utilisation du Tween dans les vaccins humains pose problème car il est connu pour provoquer des réactions anaphylactiques.^{5,6} Pour pallier cet inconvénient, l'utilisation de copolymères amphiphiles biorésorbables pourrait être une alternative attrayante aux émulsifiants de faible poids moléculaire. Ces systèmes, sous forme de nanoparticules polymères émulsionnées combinées à des adjuvants et à des composés immunostimulants, permettent d'augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire vis-à-vis d'antigènes associés à des tumeurs (TAA). En effet, le virus de la grippe inactivé combiné à l'ovalbumine a récemment démontré chez la souris une capacité à induire des réponses entre anticorps et antigène spécifique.⁷⁻¹¹ Cette propriété a été étendue à l'immunothérapie contre les pathogènes associés aux cancers en constatant que les émulsions utilisant des polymères et des peptides biologiquement actifs associées aux MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I induisaient une immunité anti-cancéreuse plus élevée, comparée aux peptides seuls.^{12,13} Ainsi, la combinaison de systèmes de délivrance de principes actifs polymères avec des composés immunostimulants offre la possibilité d'une activité complémentaire et synergique sur les réponses immunitaires.

Ainsi, la fonctionnalisation d'un système polymère par ces molécules immunostimulantes en extrémité des blocs hydrophiles apparaît intéressante car elle permettrait d'augmenter ou moduler l'efficacité d'un PA spécifique après injection dans le corps humain en présentant ces molécules à la surface des nano-objets formés.

Dans un premier temps, nous allons étudier les différentes stratégies envisageables pour obtenir des copolymères peigne tribloc, semblables à ceux du chapitre précédent, dont les extrémités des branches hydrophiles peuvent être fonctionnalisées. Nous décrirons la modification d'un monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA) et sa copolymérisation sur un macroamorceur PLA difonctionnel permettant l'obtention d'un copolymère peigne tribloc. Nous illustrerons ensuite la possibilité de fonctionnalisation d'un tel système avec le greffage d'une molécule modèle, la rhodamine, qui sera présente à la surface des nano-objets formés en milieu aqueux.

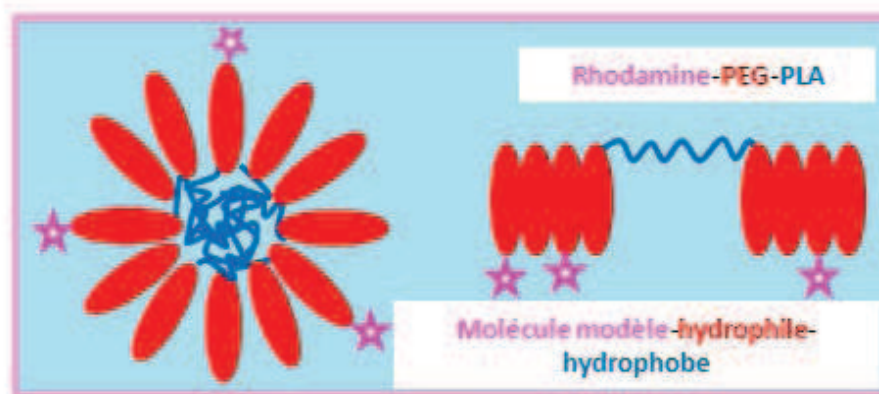


Figure IV-1 Fonctionnalisation d'un copolymère peigne tribloc

Ensuite, dans le cadre d'une collaboration, nous avons mis en place une stratégie de fonctionnalisation sur un copolymère amphiphile dibloc à base de poly(acide lactique) et de poly(éthylène glycol). Il a été décidé de le conjuguer avec un peptide immunostimulateur : la LD-indolicidine. Nous allons décrire la synthèse et l'étude des propriétés des émulsions formées à partir de ce conjugué copolymère/peptide. Le conjugué est synthétisé en plusieurs étapes. Premièrement, l' ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*bloc*-polylactide, HOOC-PEG-*b*-PLA, est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle du L-lactide en utilisant l' α -hydroxy- ω -carboxyl-poly(éthylène glycol) comme macroamorceur. Puis la fonction acide carboxylique terminale du HOOC-PEG-*b*-PLA est activée par réaction avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). La dernière étape consiste à lier par bioconjugaison la LD-indolicidine au copolymère dibloc amphiphile. La présence de l'indolicidine à l'extrémité du bloc hydrophile permet de la localiser à la surface des émulsions. Les systèmes utilisant ces conjugués seront comparés à d'autres systèmes émulsionnés (Figure IV-2). Les caractéristiques des différentes formulations sont étudiées en parallèle de leur efficacité sur l'activation de cellules immunitaires spécifiques *in vitro* et *in vivo*. De même, leurs efficacités anti-tumorales chez la souris seront évaluées et comparées.

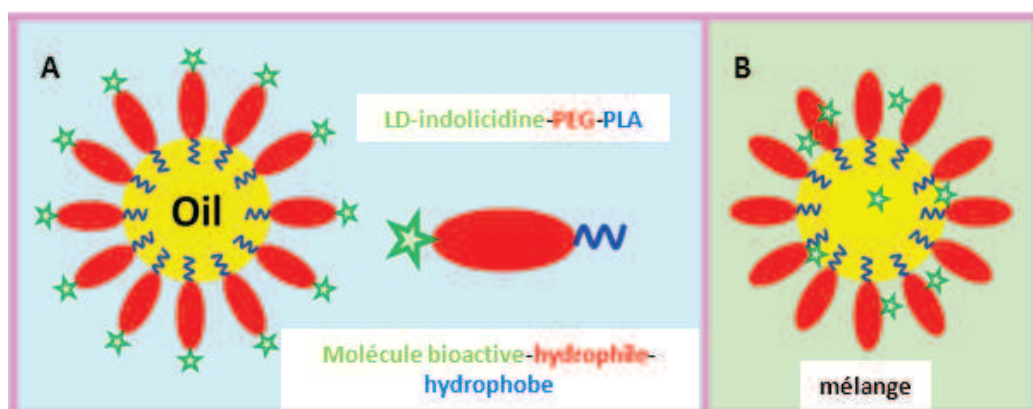


Figure IV-2 gauche : (A) Fonctionnalisation d'un copolymère dibloc et émulsion ; (B) Emulsion avec copolymère et indolicidine non liée

A. Synthèse et fonctionnalisation de copolymère peigne tribloc

La fonctionnalisation de nanoparticules de copolymères encapsulant un principe actif, permet d'ajouter des propriétés supplémentaires à ces nano-objets formés en milieu aqueux.¹⁴⁻¹⁶ Il existe de nombreux exemples dans la littérature de fonctionnalisation de nano-objets.

Ici, nous avons choisi la Rhodamine B (Schéma IV-1) comme molécule modèle car son couplage au squelette tribloc peut être détecté facilement par chromatographie d'exclusion stérique équipé d'un détecteur UV. De plus, elle est fluorescente avec, en milieu aqueux, une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc} = 554 nm) et une longueur d'onde d'émission (λ_{em} = 627 nm).

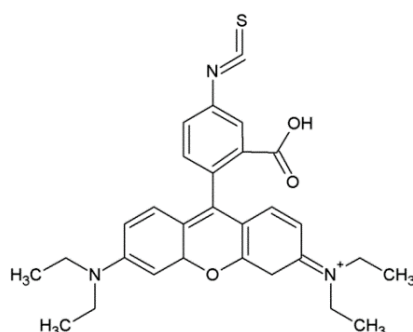


Schéma IV-1 rhodamine B isothiocyanate

Le couplage de la rhodamine B sur les extrémités de chaîne des blocs hydrophiles d'un copolymère peigne tribloc similaire à celui du chapitre précédent ne peut être réalisé qu'à partir d'un copolymère

peigne dont les extrémités de chaînes hydrophiles sont réactives. L'obtention d'un tel copolymère a été envisagée selon deux stratégies présentées sur la Figure IV-3.

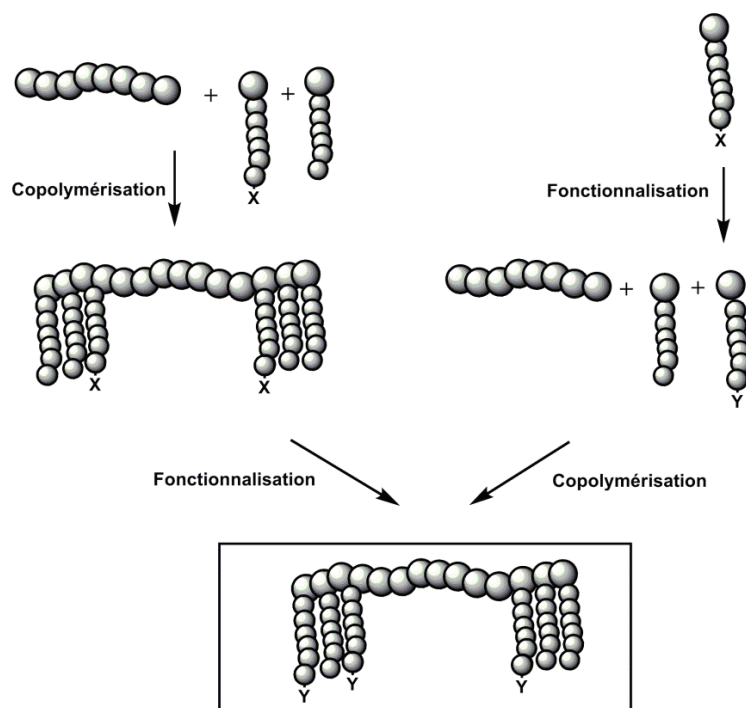


Figure IV-3 Stratégies envisagées pour l'obtention d'un copolymère peigne fonctionnalisé

La première stratégie repose sur la copolymérisation d'un monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) dont la fonction terminale est un hydroxyle OEGMA(OH) (Schéma IV-2) avec un OEGMA(OMe) en utilisant le macroamorceur difonctionnel PLA.

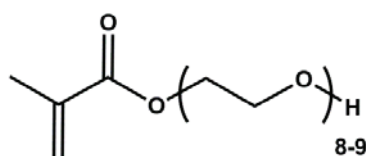


Schéma IV-2 Structure du méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) hydroxyle en bout de chaîne

Les fonctions hydroxyle pendantes seront ensuite modifiées chimiquement pour permettre le couplage de la rhodamine B *a posteriori*. Des essais de polymérisation par ATRP ont cependant révélé une réticulation lors de la copolymérisation des deux monomères sur le macroamorceur PLA donnant un gel, rendant impossible la poursuite de la stratégie.

La deuxième stratégie, reposant sur une fonctionnalisation de la fonction hydroxyle terminale du monomère OEGMA(OH) avant sa copolymérisation a donc été privilégiée.

La première étape consiste à modifier la fonction hydroxyle terminale du monomère (OEGMA(OH)) en groupement azoture avant de le copolymériser avec son homologue OEGMA(OMe) portant un groupement méthoxy en bout de chaîne. Ensuite seulement, le copolymère porteur de groupements azotures pourra réagir en deux étapes avec la molécule d'intérêt, la Rhodamine B, pour former le copolymère fonctionnalisé (Figure IV-4).

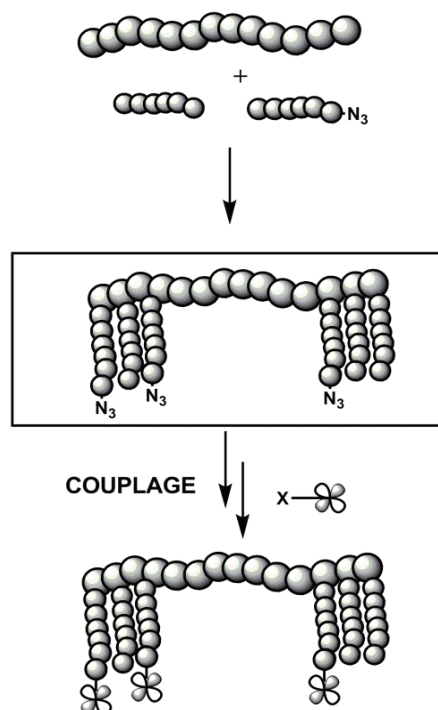


Figure IV-4 Stratégie de synthèse du copolymère tribloc fonctionnel

1. Fonctionnalisation du méthacrylate d' ω -hydroxy-oligo(éthylène glycol)

La fonctionnalisation du bout de chaîne hydroxyle a été adaptée du protocole établi par Hiki et Kataoka et décrite dans le chapitre 2.¹⁷

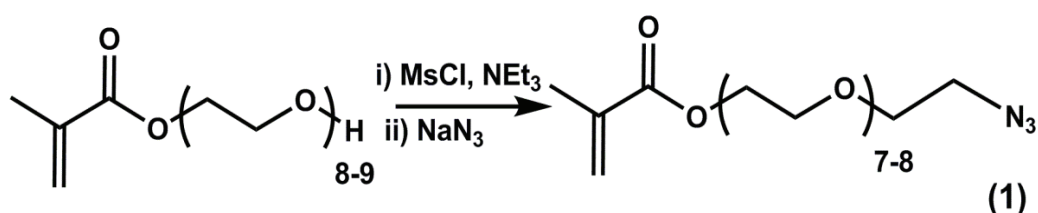


Schéma IV-3 Modification du méthacrylate d' ω -hydroxy-oligo(éthylène glycol)

Le monomère OEGMA(N₃), (1), a été préparé en 2 étapes. Le monomère (1) a été caractérisé par spectroscopies infrarouge (Figure IV-5) et RMN ¹H (Figure IV-6).

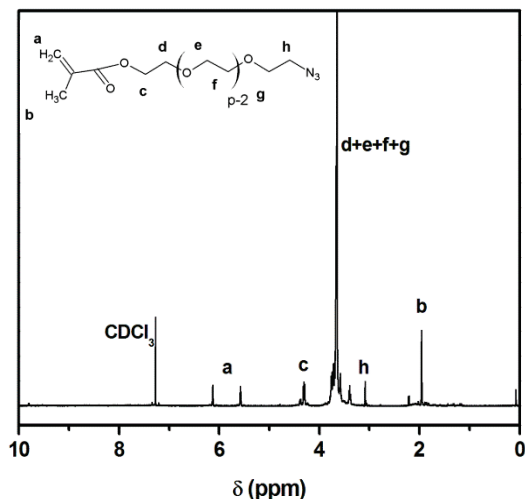


Figure IV-5 Spectre RMN ¹H du monomère azoturé

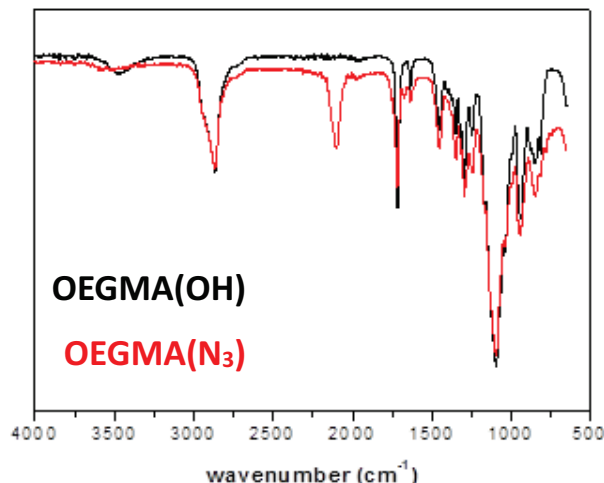


Figure IV-6 Superposition IR du monomère azoturé

Une fonctionnalisation quantitative est obtenue comme l'indique l'analyse RMN ¹H (Figure IV-5) avec l'apparition d'un signal correspondant aux protons méthylène en α de la fonction azoture à δ 3,1 ppm. Celle-ci indique également la conservation de la structure et de la fonction méthacrylate avec la présence des protons de la double liaison à δ 5,6 et 6,13 ppm et le signal à δ 4,2 ppm intégrant pour deux protons méthylène adjacents à la fonction carbonyle. Le spectre infrarouge confirme la fonctionnalisation avec la bande caractéristique de la fonction azoture à 2100 cm⁻¹, bande absente sur le monomère non fonctionnalisé (Figure IV-6).

2. Synthèse des copolymères (P(OEGMA)OMe-co-P(OEGMA)N₃)-b-PLLA-b-(P(OEGMA)OMe-co-P(OEGMA)N₃)

Un copolymère porteur de fonctions azotures est préparé par copolymérisation de type ATRP du monomère fonctionnalisé (1) avec le monomère OEGMA(OMe) en utilisant un macroamorceur de PLA synthétisé précédemment (2) (Schéma IV-4).

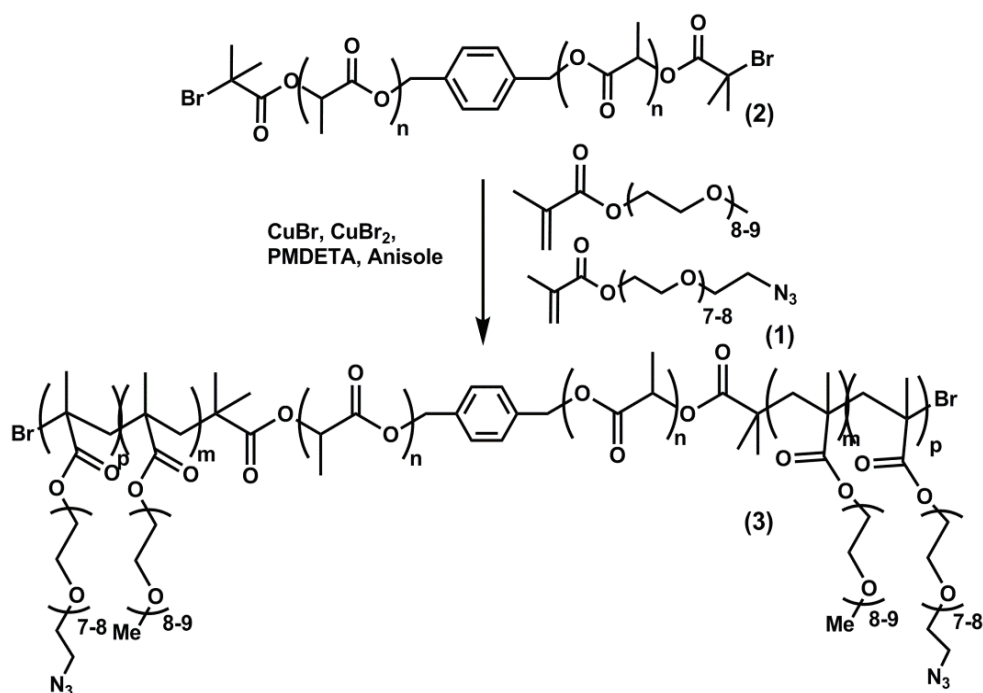


Schéma IV-4 Copolymère tribloc fonctionnalisé en bout de chaîne par des groupements azotures

L'ATRP est réalisée dans l'anisole à 60°C avec un système catalytique identique aux ATRP effectuées dans le chapitre 3. L'objectif est d'obtenir de 10 à 25% de fonctions azotures par rapport aux unités méthacrylates sur le copolymère peigne tribloc (3). Les conditions et les résultats sont listés dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 Conditions et résultats de copolymérisation

	$[\text{OEGMA}_{\text{OMe}}]/[\text{OEGMA}_{\text{N}_3}]/$ $[\text{PLA}(\text{Br})_2]$	Conv ^a %	$M_{n,\text{th}}^b$ g.mol ⁻¹	$M_{n,\text{RMN}}^c$ g.mol ⁻¹	$M_{n,\text{CES}}$ g.mol ⁻¹	D_M
3-1	45/5/1	34	11160	8700	9900	1,3
3-2	37.5/12.5/1	30	10312	14400	10700	1,2

Conditions : $[\text{PLA}(\text{Br})_2]/[\text{CuBr}_2]/[\text{CuBr}]/[\text{PMDETA}] = 1/1/2/4$, 60°C, 2 heures $M(\text{OEGMA})\text{N}_3 = 525 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M(\text{OEGMA})\text{OMe} = 475 \text{ g.mol}^{-1}$

^a déterminé par RMN ¹H ; ^b calculé selon l'équation 3.4, ^c calculé selon l'équation 3.5

La conversion du monomère méthacrylate est estimée par CES et par RMN ¹H d'après un prélèvement du milieu réactionnel en fin de réaction. Au terme des deux heures, seul 30 à 40% des monomères méthacrylates ont été polymérisés, sans possibilités de distinguer l'un par rapport à l'autre. Cependant, en partant du postulat selon lequel les différents monomères possèdent des

vitesses de polymérisation équivalentes, il est possible d'estimer des valeurs théoriques et expérimentales par RMN ^1H des branches fonctionnalisées ayant réagi. En partant des conditions initiales et du taux de conversion, il est possible de supposer que le copolymère (3-1) possède 2 branches avec des groupements azotures, tandis que le copolymère (3-2) possède 4 branches avec des groupements azotures.

La présence des fonctions azoture est confirmée par spectroscopie infrarouge du copolymère où la bande caractéristique observée à 2100 cm^{-1} . La Figure IV-7 présente la superposition du macroamorceur et du copolymère peigne tribloc.

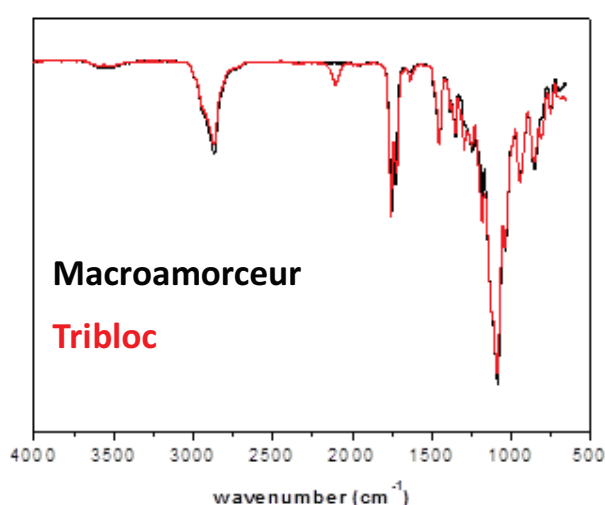


Figure IV-7 Superposition IR entre le macroamorceur 2 et le copolymère synthétisé 3-1 possédant 2 branches OEGMA(N₃)

3. Couplage du copolymère avec la rhodamine B

Nous avons choisi d'effectuer le couplage avec la rhodamine en mode « one-pot », à partir du copolymère (3) synthétisé et caractérisé précédemment à travers la formation d'un composé intermédiaire généré *in situ*.

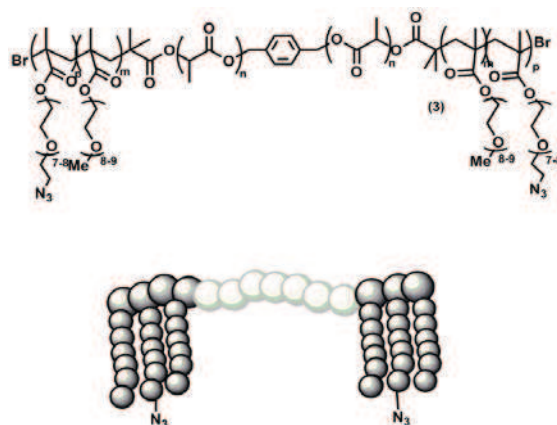


Figure IV-8 Représentation schématique du copolymère (3)

Le copolymère azoturé (3) est mis en présence de propargylamine pour générer, par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre, des fonctions amines en bout de chaîne des branches hydrophiles. Ces fonctions amine formées au cours de la réaction, peuvent ensuite réagir avec la fonction isothiocyanate de la rhodamine B rajoutée au milieu réactionnel selon le Schéma IV-5.

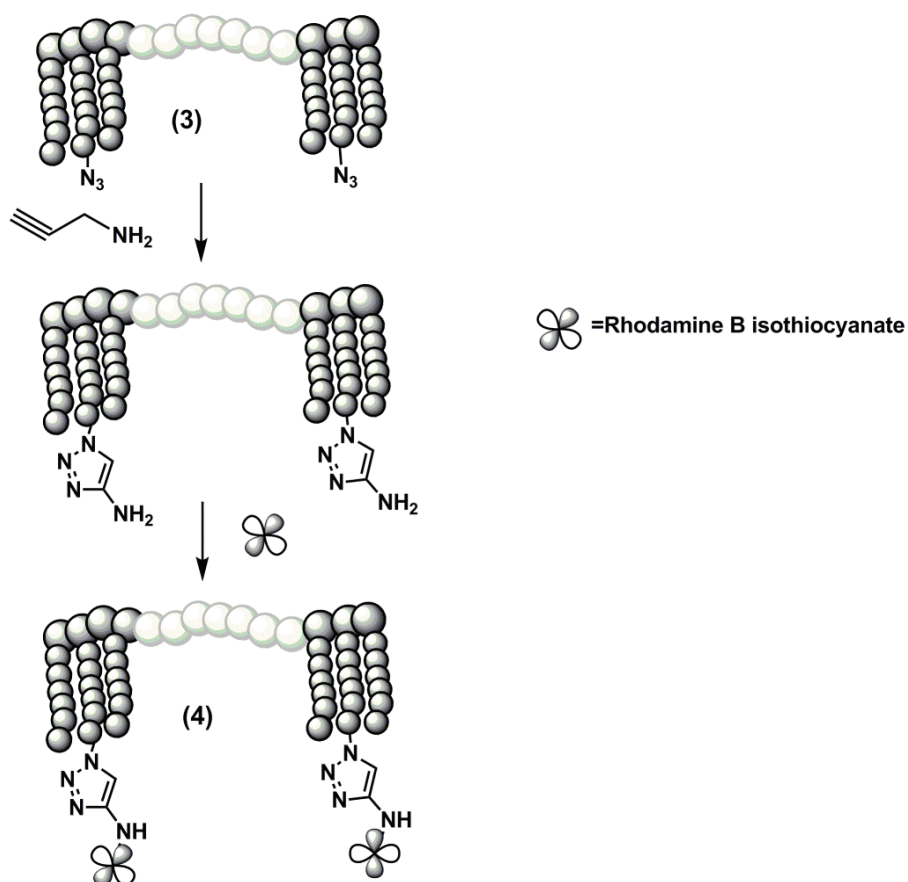


Schéma IV-5 Couplage de la rhodamine B sur le copolymère peigne tribloc

Le copolymère fonctionnalisé par la rhodamine B (4) est obtenu après purification par deux dialyses successives. La première est réalisée dans le THF, la deuxième dans l'eau, en présence d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), pour se débarrasser du cuivre et de la rhodamine résiduels. Le copolymère (4) est caractérisé par chromatographie d'exclusion stérique équipée d'un détecteur UV permettant de vérifier le greffage de la rhodamine sur le copolymère.

La CES confirme le couplage de la Rhodamine sur le squelette du copolymère puisque un signal UV est observé à 554 nm au temps de rétention du copolymère (Figure IV-9). Il reste également, malgré les dialyses successives de la rhodamine non couplée au squelette.

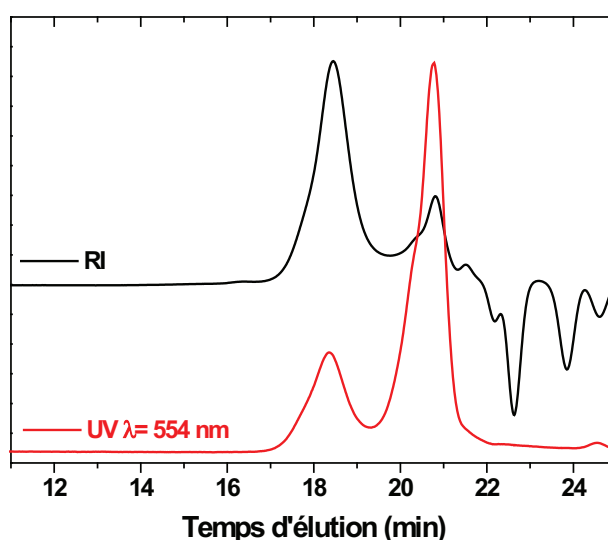


Figure IV-9 Superposition CES et UV du copolymère (4)

La fonctionnalisation effective par la Rhodamine B de ces copolymères peigne tribloc confirme la possibilité de fonctionnalisation par une stratégie chimique simple, qui peut être généralisée au couplage de molécules ayant des propriétés immunostimulantes. Ces résultats sont des résultats préliminaires démontrant la faisabilité de la fonctionnalisation.

Ensuite, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Ming-Hsi, cette stratégie a été adaptée à un copolymère amphiphile dibloc, auquel sera couplé un peptide immunostimulateur : la LD-indolicidine.

B. Synthèse d'un copolymère amphiphile dibloc et conjugaison à un peptide immunostimulateur

1. Synthèse du ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique)

Le copolymère amphiphile dibloc ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique) (HOOC-PEG-*b*-PLA) a été préparé par polymérisation par ouverture de cycle du monomère L-lactide en solution dans le toluène à 100°C en utilisant l' α -hydroxy- ω -carboxyl poly(éthylène glycol) de 5000 g.mol⁻¹ comme macroamorceur et l'octoate d'étain comme catalyseur (Schéma IV-6).

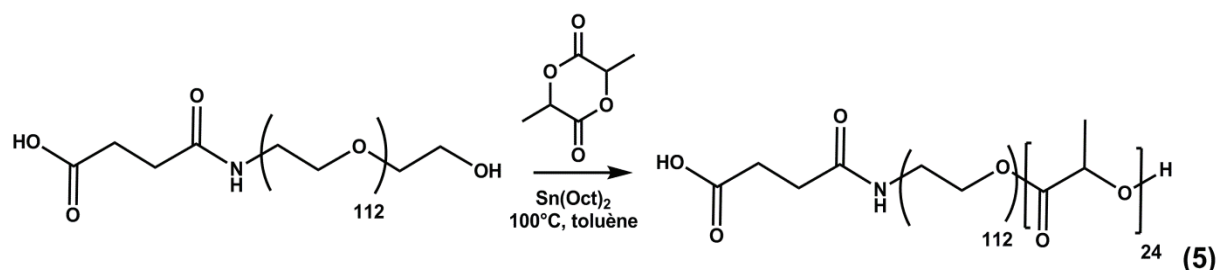


Schéma IV-6 Synthèse de l' ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique)

Le copolymère (5) a été caractérisé par spectroscopie RMN ¹H (Figure IV-12) et CES (Figure IV-10). La CES témoigne d'une distribution monomodale avec une masse molaire $M_{n,CES}$ et une dispersité \mathcal{D} de 9100 g.mol⁻¹ et 1,1 respectivement. La superposition des chromatogrammes sur la Figure IV-10 correspondant au macroamorceur (trait continu) et au copolymère dibloc (trait pointillé) confirme l'obtention d'un copolymère à bloc. En effet, le profil du copolymère (trait pointillé) est décalé vers les temps de rétention plus courts correspondant à de plus hautes masses molaires du copolymère par rapport au profil du macroamorceur de départ.

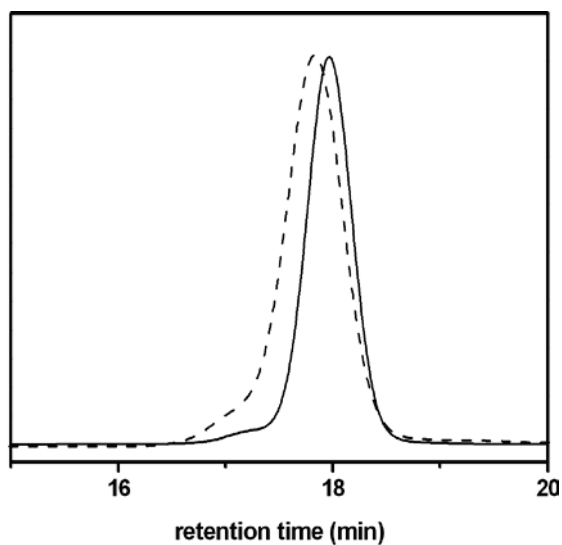


Figure IV-10 CES de HOOC-PEG ($M_{n,CES}= 6800 \text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M= 1.1$, trait continu) et HOOC-PEG-*b*-PLA ($M_{n,CES}= 9100 \text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M= 1.1$, traits pointillés)

La formation du copolymère à blocs est également confirmée par RMN DOSY. (Figure IV-11) La DOSY montre que les protons correspondant au bloc PLA et PEG présentent le même coefficient de diffusion, dont la valeur est $5,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$. Ceci se traduit par une seule bande de corrélation sur une ligne horizontale. Les blocs appartiennent donc à la même macromolécule, confirmant la polymérisation du lactide sur le macroamorceur PEG.¹⁸

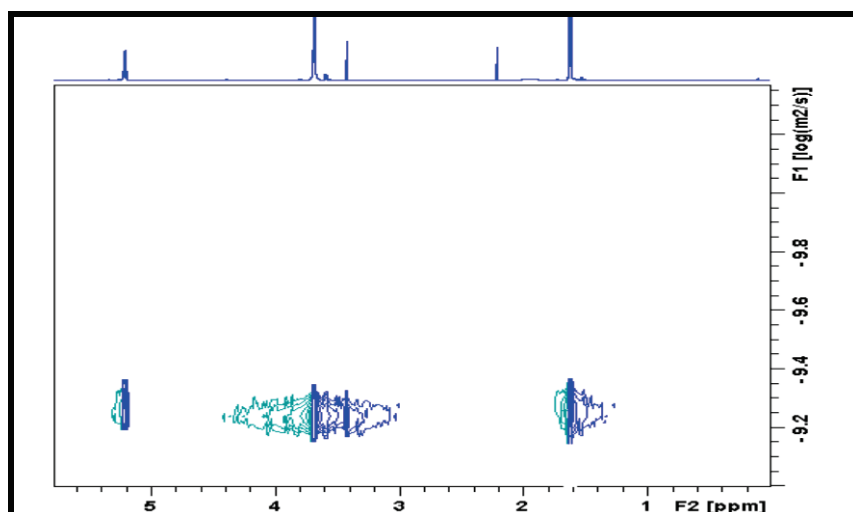


Figure IV-11 Spectre RMN DOSY du copolymère dibloc ($M_{n,RMN}=9100 \text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D}_M=1,1$)

La Figure IV-12 présente le spectre RMN ^1H du copolymère dibloc. Les pics à δ 5,2 et 1,6 ppm sont associés au squelette PLA, tandis que le signal à δ 3,6 ppm est attribué aux protons des motifs du squelette PEG. Les signaux à δ 2,5 et 2,6 ppm sont les protons méthylène proches de la fonction acide carboxylique terminale.

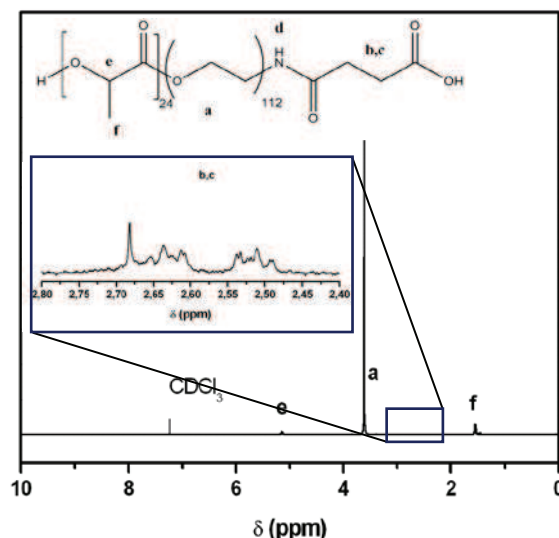


Figure IV-12 Spectre RMN ^1H du copolymère dibloc ($M_{n,RMN}=9100\text{g.mol}^{-1}$, $\bar{D}=1,1$)

Le degré de polymérisation du lactide (DP_{PLA}), la composition du copolymère dibloc et la masse molaire du copolymère sont déterminés par RMN ^1H selon les équations 4-1 à 4-3. Les caractéristiques du copolymère (5) sont listées dans le Tableau IV-2. Le rapport des unités hydrophiles sur hydrophobes est calculé à partir de l'intensité relative des protons méthyne des unités acide lactique à δ 5,2 ppm et des protons des unités éthylène glycol à δ 3,6 ppm et donne une valeur de 4,7.

Tableau IV-2 Caractérisation du copolymère HOOC-PEG-*b*-PLA(OH)

	[LA]/[PEG]/[Sn]	Conv ^a %	$M_{n,th}^b$ g.mol ⁻¹	$M_{n,RMN}^c$ g.mol ⁻¹	DP_{PLA}^d	$M_{n,CES}$ g.mol ⁻¹	\bar{D}_M	B^e
1	20 : 1 : 0.2	86	7500	6700	12	9100	1,10	4,7

Conditions à 100°C dans le toluène pendant 5 heures

^a déterminé par RMN ^1H , ^b calculé selon l'équation 4.1, ^c calculé selon l'équation 4.2, ^d calculé avec l'équation 4.3, ^e calculé avec l'équation 2.1

Une bonne corrélation entre la masse molaire théorique $M_{n,th}$ et la masse molaire expérimentale $M_{n,RMN}$ calculées à partir des équations 4.1 et 4.2 est observée. Ces différentes analyses confirment

l'obtention d'un copolymère à bloc, synthétisé de manière contrôlée. L'étape suivante est l'activation de la fonction terminale acide carboxylique.

$$M_{n,th} = M_n(PEG) + \frac{[LA] \times M_n(LA)}{[PEG]} \times conv \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$M_{n,RMN} = \frac{1/2 I_s \times M_n(LA)}{1/454 I_a} + M_n(PEG) \quad \text{Eq. 4.2}$$

$$DP_{PLLA} = \frac{1/2 I_s}{1/454 I_a} \quad \text{Eq. 4.3}$$

2. Activation de la fonction acide carboxylique du bloc poly(éthylène glycol)

Le copolymère à bloc HOOC-PEG-*b*-PLA a été fonctionnalisé par un groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former le copolymère fonctionnalisé (6) NHS-PEG-*b*-PLA selon le Schéma IV-7. La fonctionnalisation avec un groupement *N*-hydroxysuccinimide a été choisie car c'est un bon groupe partant lors d'une réaction de couplage visant à former une liaison amide avec une molécule porteuse d'une fonction amine terminale.¹⁹

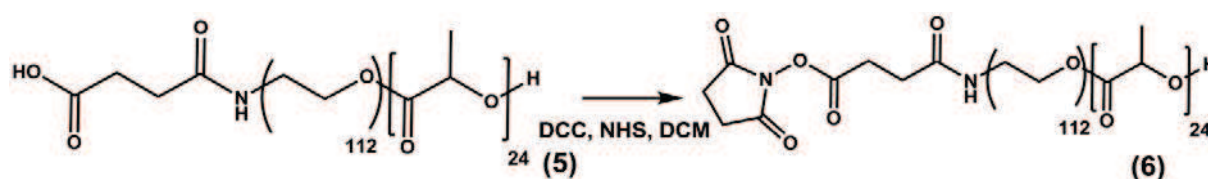


Schéma IV-7 Activation de la fonction terminale acide carboxylique

La Figure IV-13 présente le spectre RMN ¹H du copolymère dibloc activé NHS-PEG-*b*-PLA. L'incorporation de la molécule de *N*-succinimide est confirmée par le décalage des signaux des protons méthylène proches de la fonction acide carboxylique dans le copolymère (6) à δ 2,6 et 2,9 ppm et par l'apparition d'un nouveau signal à δ 2,8 ppm attribué aux 4 protons méthylène du

groupement N-succinimide. La modification du bout de chaîne du copolymère est quantitative d'après la RMN ^1H .

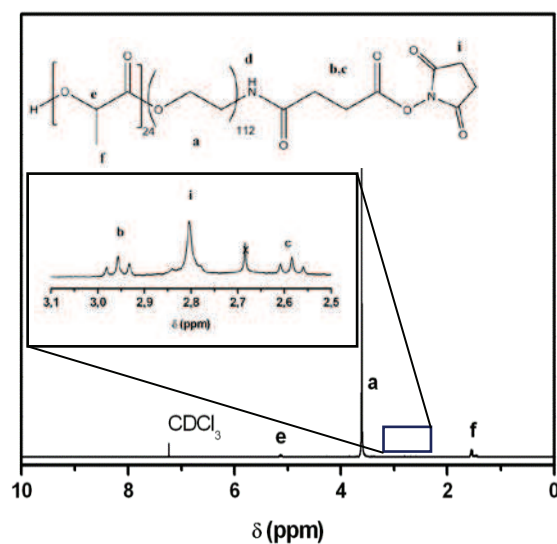


Figure IV-13 Spectre RMN ^1H du copolymère dibloc NHS-PEG-PLA ($M_{n,RMN}=9000\text{g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1,1$)

Comme le montre la Figure IV-14 avec la superposition des profils CES du HOOC-PEG-*b*-PLA et du NHS-PEG-*b*-PLA, les masses molaires, $M_{n,CES}$, et les dispersités, \mathcal{D}_M , restent inchangées, preuve qu'aucune coupure de chaîne ou dégradation n'a eu lieu au cours de la réaction.

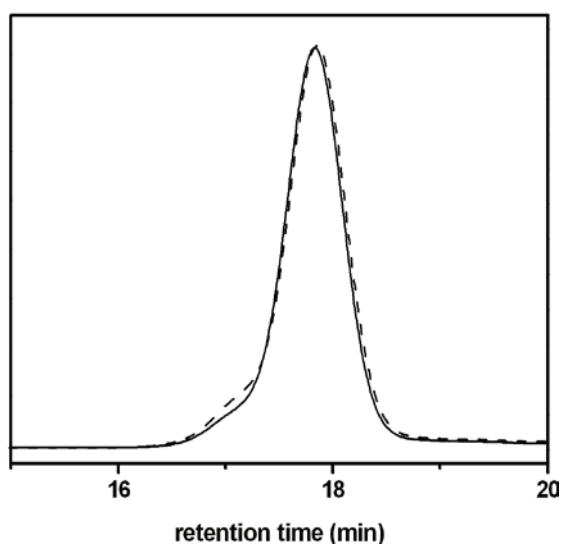


Figure IV-14 CES du HOOC-PEG-*b*-PLA ($M_n=9100\text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1,1$, trait continu) et du NHS-PEG-*b*-PLA ($M_n=9000\text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D}_M=1,1$, trait pointillé)

3. Conjugaison du peptide immunostimulant au copolymère dibloc amphiphile

a. L'indolicidine

L'indolicidine est un peptide antimicrobien cationique constitué de 13 acides aminés, présent dans les neutrophiles chez le bœuf. Il fait partie de la catégorie des peptides utilisés naturellement pour augmenter la réponse immunitaire autrement dénommée SHDP ou "small host defense peptide".

Pour cette étude, un analogue stéréoisomère de l'indolicidine, noté LD-indolicidine, a été synthétisé par SPPS (solid phase peptide synthesis) selon le protocole décrit par Chang *et al.* par l'équipe du Dr Ming-Hsi Huang (Schéma IV-8).²⁰

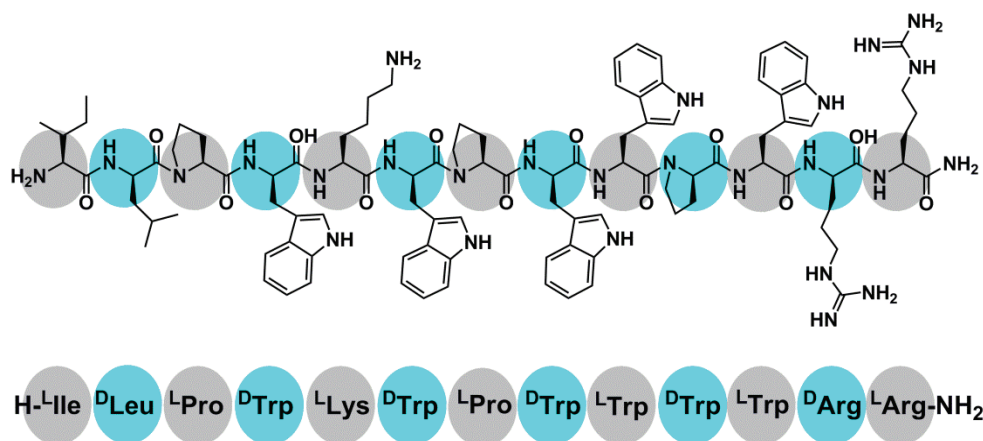


Schéma IV-8 Structure de la LD-indolicidine

La LD-indolicidine possède une haute stabilité vis-à-vis de la dégradation enzymatique en parallèle d'une bonne tolérance *in vivo* chez la souris. De précédentes expériences ont démontré que le peptide de synthèse induisait une augmentation et une amélioration de la réponse immunitaire lors de la formulation de vaccins utilisant le virus inactivé H5N1 comme antigène modèle. Ainsi, l'adjuvantation avec ce type de peptide, au contraire de l'utilisation de sels minéraux d'aluminium (Alun) permet de réguler la réponse immunitaire.

La conjugaison à un système amphiphile polymère permet, à la différence d'un simple mélange des deux composés, d'immobiliser le peptide et de le présenter à la surface des émulsions après formulation.

b. Couplage du copolymère dibloc amphiphile avec le peptide immuno-modulateur : la LD-Indolicidine

La LD-Indolicidine a été couplée au copolymère à blocs NHS-PEG-*b*-PLA par conjugaison de l'extrémité amine du peptide avec l'extrémité carboxylique activée par le groupement succinimide du poly(éthylène glycol). Un conjugué polymère-peptide (7) est ainsi préparé (Schéma IV-9).

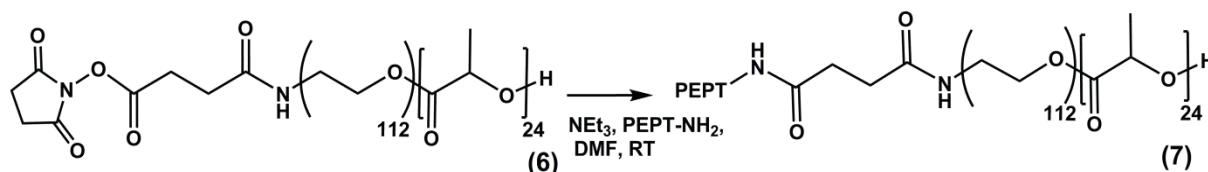


Schéma IV-9 Couplage avec l'indolicidine

L'efficacité de la ligation avec le peptide a été confirmée par RMN DOSY 2D, un des outils précédemment utilisés pour caractériser les copolymères à blocs et greffés.¹⁸ La Figure IV-15 présente la DOSY effectuée sur le conjugué dans du DMF-*d*₇.

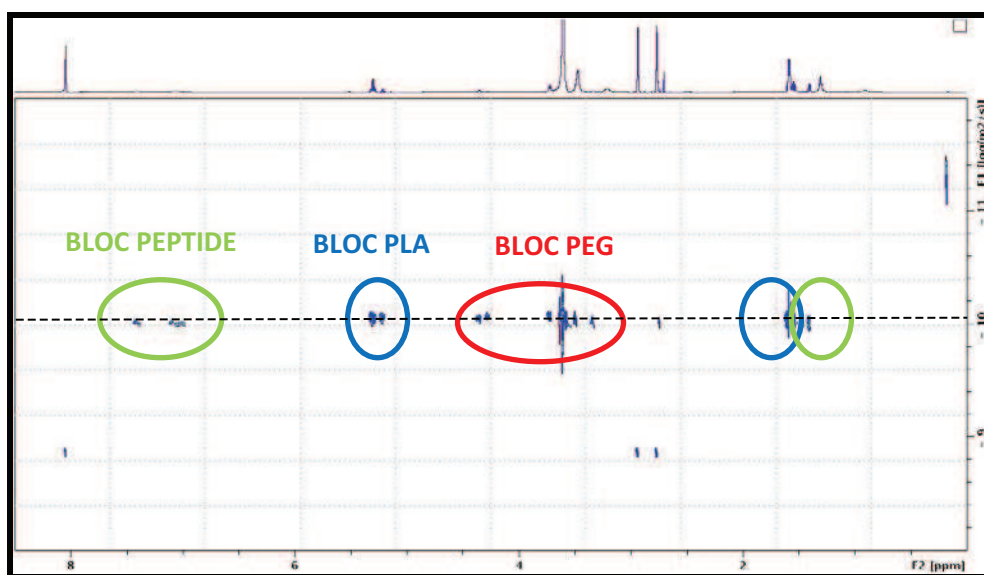


Figure IV-15 Spectre RMN DOSY du conjugué

L'analyse du spectre RMN ¹H confirme l'apparition de nouveaux signaux attribués au peptide (δ 6,8-7,6 et 1,2 ppm) tandis que les signaux correspondants au bloc poly(acide lactique) et au bloc poly(éthylène glycol) sont retrouvés à δ 5,2 ; 1,6 ppm et δ 4,3 ; 3,7 ppm respectivement. Les signaux RMN ¹H des différents blocs présentent le même coefficient de diffusion $D=9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, confirmant une ligation du peptide au copolymère. Aucune trace de peptide résiduel n'a été

observée puisque le coefficient de diffusion du peptide dans une solution de DMF- d_7 est de $D=1,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. L'autre espèce présente correspond au DMF deutéré utilisé. En effet, le coefficient de diffusion des protons relatifs au solvant DMF- d_7 est de $D=1,26 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. La Figure IV-16 représente la superposition des spectres RMN DOSY, dans le DMF- d_7 des différentes étapes de synthèse avec le copolymère activé (rose), le peptide seul (vert) et le conjugué (bleu).

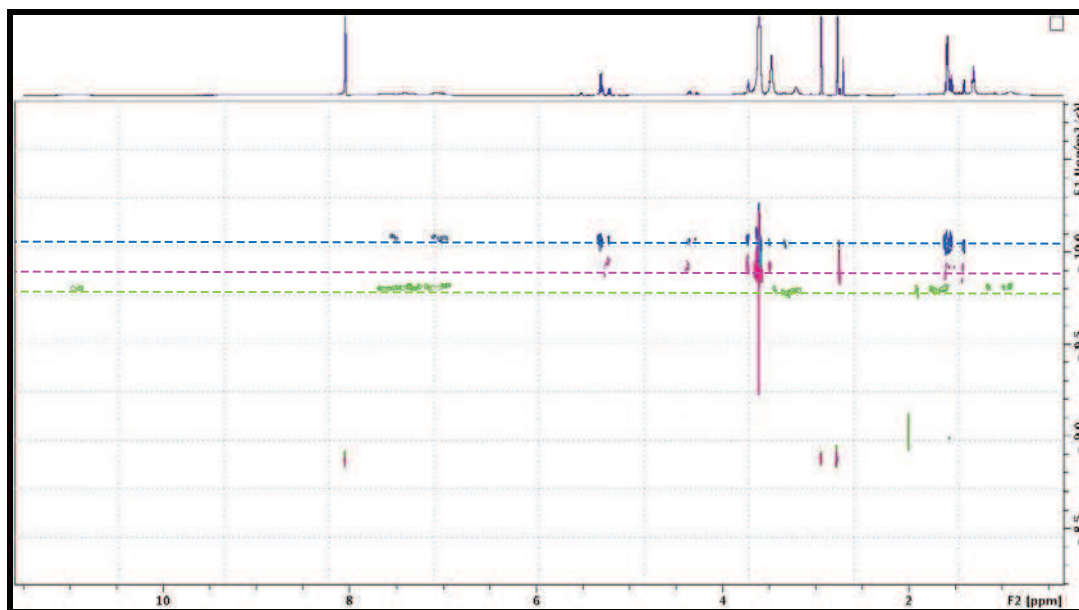


Figure IV-16 Superposition des RMN DOSY du PLA-*b*-PEG, du peptide et du conjugué
bleu : copolymère conjugué, rose : copolymère seule, vert : peptide seul

Comme le conjugué ne peut pas être caractérisé par les techniques conventionnelles de chromatographie, la RMN DOSY peut être considérée comme une méthode de RMN chromatographique fournissant les preuves d'un attachement réussi du peptide à la macromolécule.

4. Formation de nano-objets en milieu aqueux et étude de stabilité

Premièrement, le copolymère PEG-*b*-PLA seul a été mélangé au squalène pour former une émulsion anisotrope. Le squalène a été choisi pour former le cœur car c'est un métabolite naturellement présent dans l'organisme humain. C'est un précurseur du cholestérol, de la vitamine D et de plusieurs hormones.²¹ Il est utilisé comme adjuvant dans les formulations de vaccins. Un deuxième type d'émulsion a été préparé, où la LD-indolicidine est mélangée au squalène et au copolymère sans y être liée de manière covalente. La dernière formulation est réalisée avec le conjugué toujours en présence de squalène. La stabilité des différentes émulsions, et donc l'affinité de l'eau avec ces

émulsions a été étudiée par diffusion de la lumière. La Figure IV-17-A présente l'aspect des émulsions à différents temps et différentes températures. La Figure IV-17-B présente le diamètre des nano-objets formés et l'évolution de ce diamètre en fonction du temps à trois températures différentes. Les données présentées dans la Figure IV-17-B sont le résultat de trois expériences indépendantes.

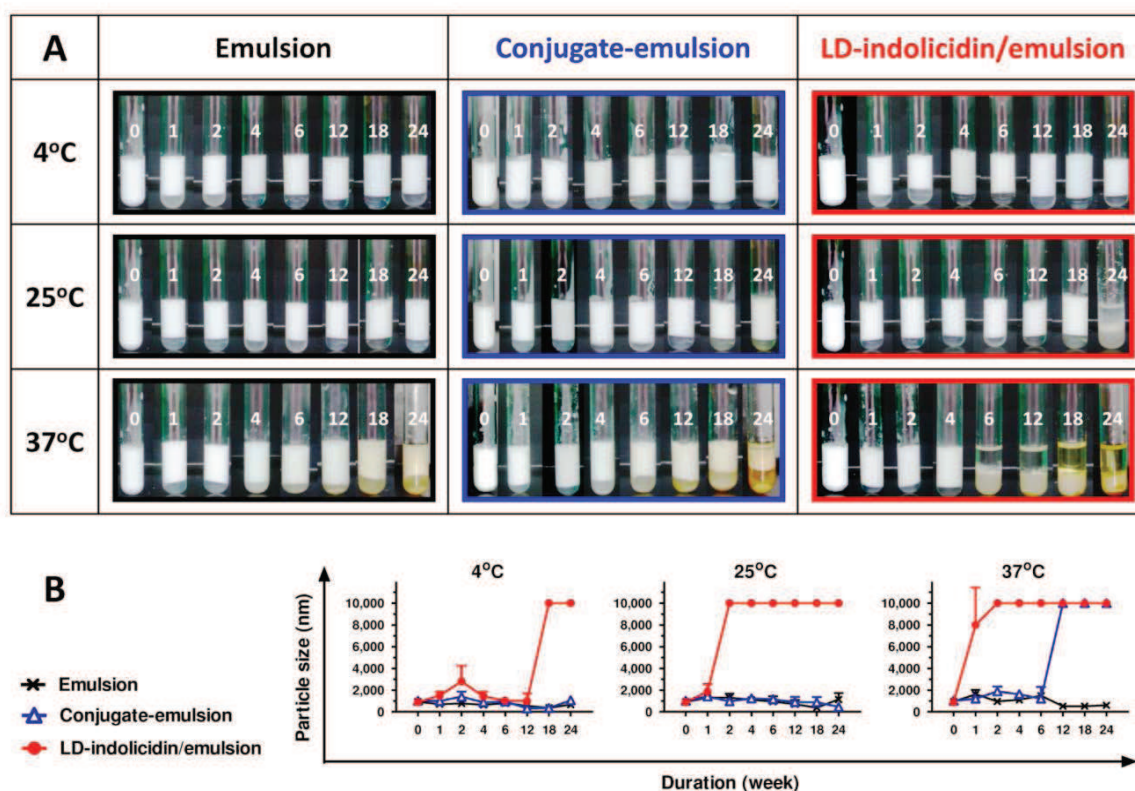


Figure IV-17 (A) aspects visuels

(B) Analyse DLS des émulsions en fonction des conditions de stockage à 4°C, 25°C et 37°C pendant 6 mois.

Des particules émulsionnées homogènes sont obtenues au début. Visuellement, il apparaît que les trois émulsions présentent un profil similaire à 4°C et 25°C (Figure IV-17-A). En revanche, à 37°C, il apparaît clairement que l'émulsion contenant l'indolicidine et le copolymère non lié est destabilisée à partir de 6 semaines, alors que les autres formulations restent stables jusqu'à 18 semaines au minimum.

Ces données ont été confirmées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les études de DLS indiquent une distribution monomodale avec un diamètre hydrodynamique moyen de 1000 nm pour les trois types d'émulsions (Figure IV-17-B). Dans le cas du dibloc et du conjugué, les formulations restent stables jusqu'à 24 semaines à 4°C et 25°C, tandis que l'émulsion avec le mélange non lié

coalement se montre très instable dès la 1^{ère} semaine à 25°C et 18 semaines à 4°C. En effet, les émulsions constituées du dibloc et du peptide fusionnent entre elles, contribuant à augmenter le diamètre des particules, à cause de la démixion du squalène et de l'eau qui sont immiscibles. Le peu de différence observé entre l'émulsion du dibloc et du conjugué indique que le copolymère lié au peptide permet de préserver le comportement d'émulsifiant intrinsèque du copolymère dibloc PEG-*b*-PLA. Une instabilité est toutefois observée pour un stockage à 37°C à partir de 6 semaines, due à la dégradation du bloc PLA. Cette dégradation affecte le comportement d'émulsifiant et la stabilité du conjugué, amenant à une désintégration de l'émulsion.

Au vu des données présentées ci-dessus, la conjugaison du peptide au copolymère amphiphile permet d'obtenir des émulsions présentant une plus grande stabilité.

C. Evaluation des propriétés immunostimulantes du conjugué et comparaison avec d'autres systèmes

1. Efficacité immunostimulante sur les cellules dendritiques.

L'utilisation de cellules dendritiques (DCs) pour générer une réponse immunitaire anti-cancéreuse peut être effectuée selon de nombreuses voies et requiert de nombreuses étapes. Vanneman & Dranoff définissent le mode d'action des vaccins contre le cancer comme l'induction d'une réponse immunitaire spécifique chez l'hôte à travers l'utilisation d'antigènes associés aux tumeurs (TAA). L'antigène amené par les systèmes de délivrance de principes actifs est d'abord internalisé par les APC (antigen presenting cells), dont les cellules dendritiques font partie, puis fragmenté en épitopes ou peptides antigéniques présentés aux lymphocytes T et aux CD4⁺ à travers les MHC (major histocompatibility complex) de classes I et II. Ces lymphocytes sont alors en mesure d'attaquer les cellules tumorales présentant les antigènes et aident les lymphocytes B à produire des anticorps menant à la mort des cellules cancéreuses.²²

a. Stimulation *In Vitro*

Le conjugué, le dibloc et le peptide sont utilisés pour déterminer si le couplage de la LD-indolicidine au dibloc de type PEG-*b*-PLA induit un phénomène d'activation ou de maturation des DCs supérieur aux autres composés. Les cellules dendritiques immatures (iDC) ont été co-incubées pendant 18 heures, soit avec un sérum physiologique seul, soit avec un lipopolysaccharide (LPS) qui sert de contrôle positif, soit avec un des trois différents composés à concentrations variables. Les niveaux

d'expression des CD40, CD80 et CD86, marqueurs typiques d'activation des DCs sur les CD11c+, ont été déterminés par cytométrie en flux. Les valeurs présentées Figure IV-18 sont le résultat d'une moyenne de trois expériences indépendantes. Les aires gris clair représentent les DCs co-incubées avec le sérum physiologique seul, tandis que les gris foncées sont incubées avec le contrôle positif LPS. L'étude de la Figure IV-18-A démontre que le dibloc seul n'induit pas de changement phénotypique des cellules dendritiques, tandis que le conjugué induit ce changement d'une manière dépendante à la concentration utilisée, tout comme la LD-indolicidine non liée.

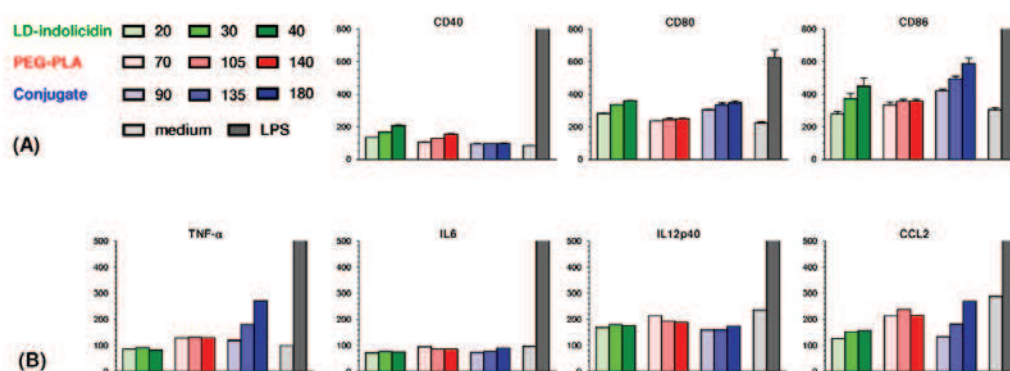


Figure IV-18 Etude de la maturation des DC

(A) expression en surface des cellules

(B) sécrétion de cytokines et chimiokines sur les DC stimulées avec les différents composés.

Puisque les DCs activées sécrètent des cytokines et d'autres molécules inflammatoires capables de réguler la réponse immunitaire, les effets du conjugué, du peptide et des autres composés sur cette sécrétion ont été étudiés. Les concentrations des différentes molécules ont été déterminées par ELISA, à partir de trois expériences indépendantes. A partir de la Figure IV-18-B, il peut être noté que des molécules immunostimulatrices comme le LPS sont capables d'induire la sécrétion de TNF-α et d'une variété d'interleukines comme l'IL-6 ou encore l'IL-12p40, alors que la LD-indolicidine non liée n'est pas en mesure de produire un tel effet. Le conjugué synthétisé présente une augmentation de la production de TNF-α et de CCL2, indiquant que celui-ci joue un rôle important dans l'activation des DCs.

Ainsi, comparé au contrôle (sérum physiologique seul), il apparaît que l'émulsion contenant le peptide non lié, et celle contenant le conjugué sont capables de stimuler l'activation et la maturation de iDC puisqu'elles induisent l'expression de marqueurs de maturation (CD80, CD86) en parallèle de la production de cytokines et chimiokines (TNF-α, CCL-2) qui ne peuvent être sécrétées qu'à partir de DCs activées.

b. Stimulation *In Vivo*

Le système lymphatique a un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire.²³ Les DCs capturant les antigènes dans les tissus périphériques migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques. C'est pendant ce trajet que les antigènes internalisés sont transformés en peptides antigéniques capables d'interagir avec les lymphocytes T.

Afin de déterminer l'impact des différents candidats sur les cellules immunitaires, les souris (souche C57BL/6) ont été immunisées avec la protéine OVA seule ou formulée avec la LD-indolicidine non liée, le dibloc, le conjugué avec ou sans squalène en injection sous-cutanée. Puis l'expression des marqueurs d'activation des DCs (CD40, CD86) et des marqueurs d'activation en réponse à la stimulation par un antigène (MHC classe II) a été déterminée par cytométrie en flux sur les CD11c+ à partir des cellules récoltées dans les ganglions lymphatiques.

Comme le montre la Figure IV-19-A, les formulations sous forme d'émulsion apparaissent nécessaires pour que la LD-indolicidine et le conjugué témoignent d'une activité immunitaire *in vivo*. En effet, les émulsions augmentent l'activation des CD11c+ avec un haut taux d'expression du MHC de classe II, des CD40 et CD86, comparé aux autres formulations. Ceci peut être expliqué par la formulation qui permet une libération contrôlée, prolongeant la stimulation du système immunitaire avec l'antigène OVA.

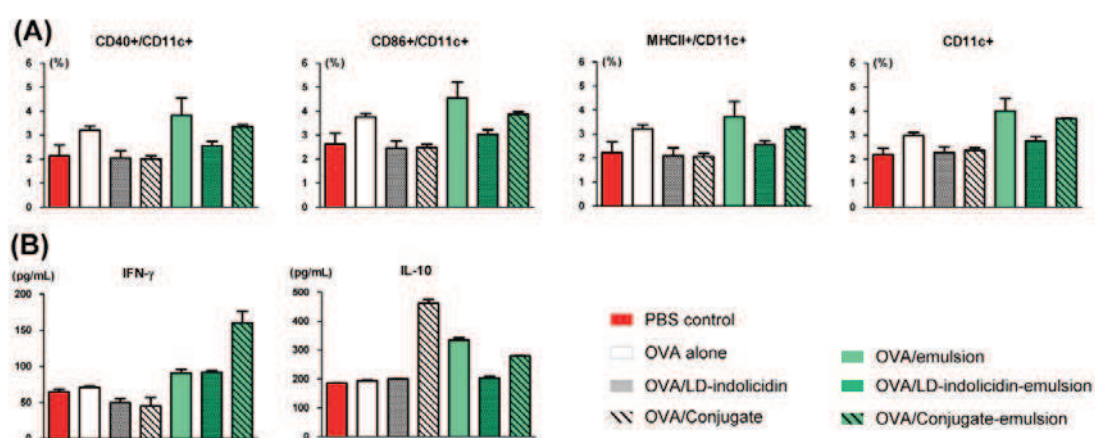


Figure IV-19 Activation des cellules dans les ganglions lymphatiques après injection sous-cutanée des différentes formulations

(A) données récoltées sur les CD11c+

(B) expression des cytokines et chimiokines

La sécrétion de cytokines à partir des cellules T a été mesurée dans le foie après une nouvelle stimulation des cellules *in vitro* avec l'antigène OVA. La Figure IV-19-B indique qu'après immunisation, l'antigène OVA seul, ou formulé avec la LD-indolicidine n'a pas pu induire de sécrétion spécifique de cytokines telles que l'IFN- γ et IL-10. L'antigène OVA formulé avec le conjugué et les différentes émulsions à base de squalène a, en revanche, été en mesure d'induire la sécrétion des cytokines spécifiques. Quelques différences sont cependant relevées. En effet, le conjugué et l'antigène OVA sous forme d'émulsion semblent augmenter la sécrétion d'IFN- γ , noté Th1, et diminue la production d'IL-10, noté Th2. Ces deux types de cytokines interviennent dans un équilibre noté Th1/Th2 qui indique quel type d'immunisation est favorisé. Ainsi, l'augmentation de Th1, qui intervient dans l'immunisation médiée par les cellules, ou de Th2, qui intervient dans l'immunisation médiée par les anticorps, influera sur le type d'immunisation favorisé. Il apparaît que le conjugué et l'antigène OVA sous forme émulsionnée favorisent l'immunisation médiée par les cellules, tandis que le conjugué et l'antigène OVA sans squalène favorise la sécrétion d'IL-10 et donc inverse l'équilibre Th1/Th2 vers le deuxième type d'immunisation.

Les dernières analyses effectuées ont démontré une bonne tolérance pour le conjugué pour des applications *in vivo*.

2. Etude *in vivo* d'un système de délivrance d'un antigène sous forme d'émulsion avec le conjugué LD-Indolicidine-PEG-*b*-PLA

Le modèle d'immunothérapie cancéreuse utilisé ici pour évaluer le potentiel des différentes formulations est celui de la protéine OVA sur les cellules cancéreuses EG7.

Dans un premier temps, 2×10^5 cellules EG7 ont été injectées à chaque souris de souche C57BL/6. A partir de l'apparition de tumeurs palpables, 6 souris par groupe ont été immunisées avec 10 μ g de protéine OVA pour chaque formulation étudiée à partir du 7^e jour. Le volume de la tumeur et le taux de survie des souris a été étudié et illustré dans la Figure IV-20. Le volume des tumeurs a été évalué deux fois par semaine avec des étrières. Les données sont présentées comme la moyenne de trois expériences indépendantes. Les aires bleues et grises correspondent respectivement au groupe de contrôle avec le PBS et à l'émulsion avec le conjugué.

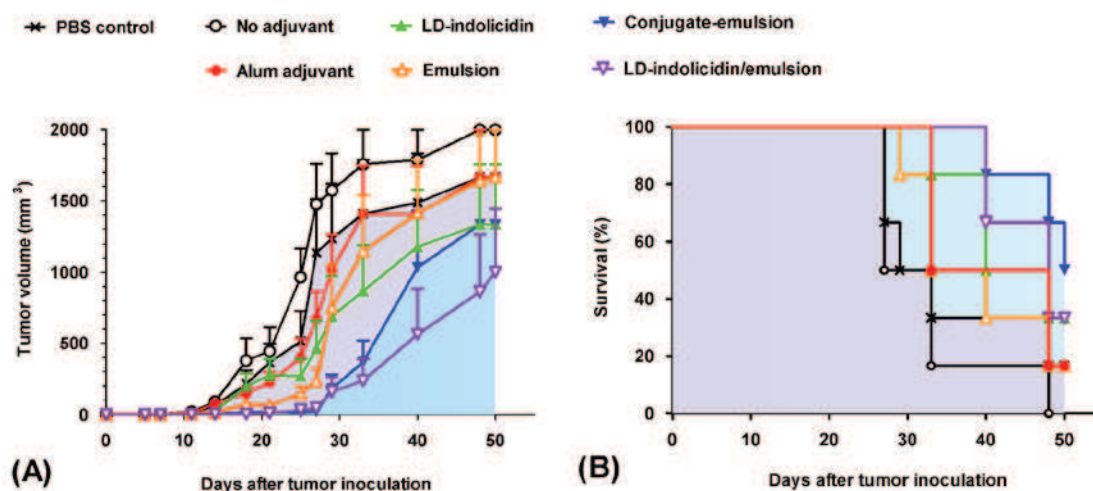


Figure IV-20 Efficacité anti-tumorale des formulations contenant la protéine OVA sur les souris C57BL/6 présentant les cellules cancéreuses type EG7

(A) volume de la tumeur

(B) taux de survie

Sans traitement, le groupe de contrôle montre une augmentation considérable du volume de la tumeur menant à une mort des souris en 30 jours (Figure IV-20-A). De manière similaire, aucun phénomène d'immunisation n'est observé lorsque la protéine OVA est injectée seule, sans adjuvant et la population de souris étudiée meurt en 60 jours. La protéine injectée avec les sels d'aluminium n'impacte pas non plus la croissance de la tumeur ou la survie des souris. La vaccination utilisant l'émulsion avec le conjugué et la protéine OVA fournit un effet protecteur plus important avec une croissance tumorale freinée, mais insuffisante pour éradiquer les cellules cancéreuses EG7. Cependant, cette formulation élimine une bonne proportion des cellules et témoigne d'une efficacité accrue en comparaison avec la LD-indolicidine seule.

Le taux de survie des souris des groupes correspondants au conjugué et à l'LD-indolicidine sous forme d'émulsion est dans les deux cas amélioré (Figure IV-20-B). Cependant, seules les souris ayant reçu la formulation contenant le conjugué et la protéine OVA affichent un taux de survie supérieur à 50% après 50 jours.

Il apparaît ainsi que les émulsions à base de squalène, et utilisant le conjugué augmentent l'efficacité immunostimulante de la LD-indolicidine et prolonge la survie des souris.

Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif la fonctionnalisation de différents systèmes polymères dans le but de conférer des propriétés bioactives *in vivo*, pouvant renforcer l'activité du principe actif.

Une stratégie a été mise en place pour fonctionnaliser les extrémités de chaîne hydrophile d'un copolymère peigne tribloc et sa fonctionnalisation a été effectuée avec une molécule modèle, la rhodamine, facilement détectable. Cette démarche permet d'envisager le couplage d'autres molécules d'intérêt telles que la LD-indolicidine qui a été couplé à un copolymère amphiphile dibloc pour des raisons pratiques et étudié dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Minghsi Huang. Les différentes études démontrent que des particules stables sont formées avec le conjugué, avec des diamètres permettant l'internalisation par les DCs, à travers le phénomène de macropinocytose. De même, leur utilisation contribue à augmenter l'activation et la maturation de ces DCs à travers l'expression de CD40 ou CD86 et permet de sécréter des cytokines comme le TNF- α . Ces composés, stabilisés par le squalène et le copolymère amphiphile, facilitent le transport et la présentation des antigènes associés aux tumeurs ou TAA, comme la protéine OVA, et permettent d'induire une immunisation modulée et régulée par l'interaction avec les cellules et l'efficacité de l'indolicidine, prouvant leur efficacité en immunothérapie cancéreuse. Cette stratégie de fonctionnalisation d'un copolymère amphiphile dibloc, attestant d'une efficacité thérapeutique *in vivo* améliorée pourra être adaptée aux copolymères peigne sur lesquels la Rhodamine a été couplée afin de comparer l'intérêt des différentes architectures.

D. Bibliographie

1. Reed, S., Orr, M., Fox, C. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* **19**, 1597–1608 (2013).
2. Vogel, F., Caillet, C., Kusters, I., Haensler, J. Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 483–492 (2009).
3. Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D., Wack, A. The adjuvants aluminium hydroxyde and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol.* **180**, 5402–5412 (2008).
4. Roman, F., Clément, F., Dewé, W., Walravens, K., Maes, C., Willekens, J., De Boever, F., Hanon, E., Leroux-Roels, G. Effect on cellular and humoral responses of the AS03 adjuvant system in an A/H1N1/2009 influenza virus vaccine administered to adults during two randomized controlled trials. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 835–843 (2011).
5. Coors, E., Seybold, H., Merk, H., Mahler, V. polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **95**, 593–599 (2005).
6. Shelley, W., Talanin, N., Shelley, E. Polysorbate 80 hypersensitivity. *Lancet* **345**, 1312–1313 (1995).
7. Huang, M., Chou, AH., Lien, SP., Chen, HW., Huang, CY., Chen, WW. Formulation and immunological evaluation of novel vaccine delivery systems based on bioresorbable poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide-co-epsilon-caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res. -Part B Appl. Biomater.* **90**, 832–841 (2009).
8. Huang, M., Huang, CY., Lien, SP., Siao, SY., Chou, AH., Chen, HW. Development of multi-phase emulsions based on bioresorbable polymers and oily adjuvant. *Pharm. Res.* **26**, 1856–1862 (2009).
9. Huang, M., Huang, CY., Lin, SC., Chen, JH., Ku, CC., Chou, AH. Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single-dose, novel nanoemulsion-formulated pandemic influenza vaccine. *Microbes Infect.* **11**, 654–660 (2009).
10. Huang, M., Lin, SC., Hsiao, CH., Chao, HJ., Yang, HR., Liao, CC. Emulsified nanoparticles containing inactivated influenza virus and CpG oligodeoxynucleotides critically influences the host immune responses in mice. *PLoS One* **5**, e12279 (2010).
11. Lin, S., Jan, JT., Dionne, B., Butler, M., Huang, MH., Wu, CY. Different immunity elicited by recombinant H5N1 hemagglutinin proteins containing Pauci-mannose, high-mannose, or complex type N-glycans. *PLoS One* **8**, e66719 (2013).
12. Chen, W., Liu, SJ., Leng, CH., Chen, HW., Chong, P., Huang, MH. Disintegration and cancer immunotherapy efficacy of a squalene-in-water delivery system emulsified by bioresorbable poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide). *Biomaterials* **35**, 1686–1695 (2014).

13. Song, Y. Cheng, HY., CH, Leng., Chiang, SK., Lin, CW., Chong, P. A novel emulsion-type adjuvant containing CpG oligodeoxynucleotides enhances CD8+T-cell-mediated anti-tumor immunity. *J. Control. Release* **173**, 158–165 (2014).
14. Essa, S., Rabanel, J. M., Hildgen, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *Int. J. Pharm.* **411**, 178–187 (2011).
15. Zolotarskaya, O. Y., Yuan, Q., Wynne, K. J., Yang, H. Synthesis and characterization of clickable cytocompatible poly(ethylene glycol)-grafted polyoxetane brush polymers. *Macromolecules* **46**, 63–71 (2013).
16. Brambilla, D. Nicolas, J., Le Droumaguet, B., Andrieux, K., Marsaud, V., Couraud, P O., Couvreur, P. Design of fluorescently tagged poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for human brain endothelial cell imaging. *Chem. Commun.* **46**, 2602–2604 (2010).
17. Hiki, S., Kataoka, K. A facile synthesis of azido-terminated heterobifunctional poly(ethylene glycol)s for “click” conjugation. *Bioconjug. Chem.* **18**, 2191–2196 (2007).
18. Bakkour, Y., Darcos, V., Li, S., Coudane, J. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as a powerful tool for amphiphilic block copolymer characterization and for critical micelle concentration. *Polym. Chem.* **3**, 2006–2010 (2012).
19. Jiang, X., Sha, X., Xin, H., Chen, L., Gao, X., Wang, X., Law, K., Gu, J., Chen, Y., Jiang, Y., Ren, X., Ren, Q., Fang, X. Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials* **32**, 9457–9469 (2011).
20. Chang, C.-Y. Lin, CW., Chiang, SK., Chen, PL., Huang, CY., Liu, SJ., Chong, P., Huang, MH. Enzymatic stability and immunoregulatory efficacy of a synthetic indolicidin analogue with regular enantiomeric sequence. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 522–526 (2013).
21. Allison, A. Squalene and squalane emulsions as adjuvants. *Methods* **19**, 87–93 (1999).
22. Vanneman, M., Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 237–251 (2012).
23. Palucka, K., Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 265–277 (2012).

Conclusion Générale

Ce travail de thèse avait pour but principal la synthèse de nouvelles architectures de copolymères amphiphiles à base de PLA et de PEG pour la conception de systèmes de délivrance de PA. Dans la littérature, de nombreux travaux décrivent la synthèse de copolymère à blocs à base de PLA et de PEG pour ce genre d'applications. Cependant, grâce au développement des techniques de polymérisations vivantes et/ou contrôlées, les polymères présentant une architecture macromoléculaire plus complexe sont maintenant d'un accès plus facile. On retrouve dans ces architectures complexes les copolymères greffés qui ont été largement étudiés car ils présentent l'avantage d'être facilement synthétisable et possèdent des propriétés particulières en solution. Nous nous sommes donc intéressée aux différentes techniques de synthèse et de polymérisation permettant l'obtention de copolymères greffés, possédant un squelette polyester hydrophobe et portant des branches hydrophiles, à l'inverse de structures classiques généralement retrouvées dans la littérature.

Dans le premier chapitre, l'ensemble des systèmes polymères, à base de polyester et de poly(éthylène glycol), déjà décrits dans la littérature et utilisés pour la conception de système de délivrance de PA a été examiné afin de définir le contexte dans lequel se situent nos travaux. Dans un premier temps, les propriétés des polymères utilisés dans ces systèmes et leurs voies de synthèse ont été décrites. Ensuite, les différentes stratégies de synthèse permettant de générer des copolymères amphiphiles d'architectures variées, allant de copolymères linéaires à des copolymères en étoile ont été répertoriées. Les différents types d'objets formés par l'auto-assemblage en milieu aqueux de ces copolymères amphiphiles ont été définis. Le contexte applicatif, à savoir la conception de systèmes de délivrance de PA a ensuite été abordée. Par conséquent, la capacité de ces différents systèmes à encapsuler et transporter des PA a été décrite. A partir des données présentées dans le premier chapitre, les copolymères greffés à structure inverse, possédant un squelette polyester fonctionnel et des branches hydrophiles, nous ont semblé les plus intéressants. Afin d'obtenir des copolymères greffés possédant un squelette polyester fonctionnel et des branches hydrophiles, les stratégies « grafting to » et « grafting through » évoquées dans le premier chapitre se sont révélées adaptées.

Ainsi, dans un deuxième chapitre, la synthèse d'un squelette polyester porteur de fonctions alcyne pendantes est décrite. Il a été obtenu après copolymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'un monomère lactide et d'un monomère lactone fonctionnalisé par une triple liaison, la 3,2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione, obtenu au terme de quatre étapes. La modification de l'extrémité de chaîne d'un α -méthoxy- ω -hydroxy poly(éthylène glycol) en un α -méthoxy- ω -azido poly(éthylène glycol) a permis de réaliser une réaction de cycloaddition de Huisgen entre le squelette fonctionnalisé par des

groupements propargyle et les extrémités de chaîne azoture des PEG. Cette approche a permis d'obtenir des copolymères greffés bien définis dont le comportement auto-associatif en milieu aqueux a été étudié. Les caractéristiques physico-chimiques des objets formés ont été déterminées et ont révélé la formation de micelles-filaments. Les études préliminaires évaluant la capacité d'encapsulation de PA modèles ont confirmé le potentiel de ce type de copolymère greffé à constituer des systèmes de délivrance de PA.

Dans un troisième chapitre, une approche différente a permis de synthétiser un autre type de copolymère greffé. Premièrement, un bloc hydrophobe de PLA téléchélique a été synthétisé par ROP. Les extrémités de chaînes de ce bloc ont ensuite été modifiées pour qu'elles puissent amorcer la polymérisation de macromonomères méthacryliques par ATRP. Cette stratégie s'apparente à la technique « grafting through ». Ainsi, des copolymères peigne tribloc, comportant un bloc central de PLA hydrophobe et deux blocs latéraux constitué d'un squelette méthacrylate porteur de branches hydrophiles de PEG ont été obtenus. L'étude de la cinétique de polymérisation de ce type de monomère permet d'affirmer l'obtention de structures parfaitement définies. Plusieurs copolymères peigne amphiphiles tribloc de composition variable ont été synthétisés en faisant varier la masse molaire du macromonomère méthacrylate et son nombre d'équivalents. Le comportement des différents copolymères en milieu aqueux a également été étudié, et comparé à des copolymères peigne dibloc. La composition et la structure des peignes di et tribloc mettent en évidence une influence sur la morphologie des nano-objets formés en milieu aqueux. De plus, au sein même de la population des copolymères peigne tribloc différentes morphologies de nano-objets ont été observées, confirmant l'influence de la composition sur l'auto-assemblage. Le potentiel d'encapsulation a également été évalué et révélé des aptitudes similaires aux copolymères greffés. Des études préliminaires de cinétique de libération de PA ont été effectuées et témoignent d'une libération sans effet « burst ».

Enfin, dans un quatrième chapitre, la possibilité de fonctionnaliser les extrémités de chaînes hydrophiles des architectures greffées pour conférer des propriétés supplémentaires, telles que la modulation de l'action du PA par couplage avec un peptide immunostimulateur a été illustrée. Dans un premier temps, une stratégie permettant de fonctionnaliser les copolymères peigne avec la rhodamine, molécule fluorescente, sur les extrémités de chaînes des branches PEG a été mise en place. Ensuite, dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Taïwan, le couplage effectif d'un peptide immunostimulateur a été effectué sur un copolymère dibloc amphiphile. Cette approche a permis de mettre en évidence, que la conjugaison de ce type de peptide à un système

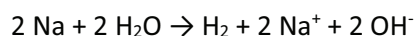
polymère renforçait l'action du PA grâce à une stabilisation des nano-objets *in vivo* et par l'intermédiaire de la stimulation de cellules cibles.

Les perspectives de ces travaux sont multiples. Concernant le deuxième chapitre, il apparaîtrait intéressant d'obtenir de nouveaux squelettes polyesters fonctionnel, toujours à base de PLA, mais en utilisant un monomère fonctionnel facilement accessible. En effet, la synthèse du monomère lactone propargylé présentée dans ce manuscrit se révèle être limitante sur le projet. Ensuite, le greffage de branches PEG de masses molaires différentes s'avèrerait intéressant. Nous pourrions ainsi évaluer l'impact de la modification de la balance hydrophile/hydrophobe sur la nature de l'auto-assemblage et ses propriétés physico-chimiques. Concernant les deux systèmes de copolymères greffés, des études physico-chimiques supplémentaires pourraient être effectuées pour confirmer la morphologie des nano-objets. Des études complémentaires de cinétique de libération devraient également être réalisées afin de confirmer le caractère continu et prolongé de la libération. Enfin, dans le dernier chapitre, il a été démontré qu'il était possible de fonctionnaliser les extrémités de chaînes hydrophiles des copolymères greffés, et que la conjugaison d'un peptide à l'extrémité hydrophile d'un copolymère à blocs montre la possibilité de moduler l'effet thérapeutique d'un PA donné. Il serait donc judicieux de coupler ce même peptide aux extrémités hydrophiles des copolymères greffés, afin de comparer l'efficacité de ce nouveau système sur la modulation de l'effet thérapeutique du même PA.

Chapitre V : Partie Expérimentale

A. Purification des réactifs

L'ε-caprolactone, le dichlorométhane (DCM), le *N,N*-diméthylformamide (DMF) et le toluène ont été séchés sur hydrure de calcium pendant 24 heures à température ambiante, puis distillés sous pression réduite. La triéthylamine (NEt₃) a été distillée sur hydroxyde de potassium. Le tétrahydrofurane (THF, Fluka) a été séché par chauffage à reflux sur un mélange benzophénone-sodium. Le changement de couleur de la benzophénone, du jaune au bleu, indique que le solvant est anhydre. Le THF est plus miscible à l'eau que l'éther diéthylique. Faire bien attention lors des distillations car le sodium décompose l'eau en hydrogène et en hydroxyde selon la réaction :



Cette réaction est exothermique. La chaleur dégagée peut suffire à faire détoner l'hydrogène produit. Il faut donc être très vigilant à bien le laisser à l'abri de l'eau ou de l'humidité et quelle que soit la distillation ne jamais distiller à sec.

Le zinc (Zn) est activé via un bain dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl), puis neutralisé à l'eau distillé, et rincé à l'éthanol avant d'être séché sous pression réduite.

Le L-lactide a été recristallisé trois fois dans du toluène sec et stocké dans des piluliers sous argon avant utilisation. Le poly(éthylène glycol) (PEG) a été distillé azéotropiquement 3 fois avec du toluène sec avant utilisation, puis séché sous pression réduite. La *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) a été recristallisée dans du toluène sec, séchée sous pression réduite, puis stockée sous argon. Le méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA) a été purifié sur colonne d'alumine basique et séché sous pression réduite.

B. Matériel d'Analyse

1. Chromatographie d'Exclusion Stérique

Les analyses de Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) ont été effectuées à température ambiante avec deux systèmes chromatographiques différents. Le premier, un système Waters constitué d'une pompe d'injection Waters 510 HPLC Pump et d'une vanne d'injection Rhéodyne de 20 µL; d'une pré-colonne et d'une colonne de gel 600 mm PLgel 5 µm Mixed C (Polymer Laboratories) conditionnée dans le THF avec un débit de 1 mL/min. Le deuxième système utilisé était un système Viscotek GPC Max équipé d'une colonne de garde Viscotek (10 × 4.6 mm) et deux colonnes Viscotek LT 5000L mixed C (300 × 7.8 mm), avec un réfractomètre Viscotek VE 3580 et un

détecteur UV/Vis Viscotek VE 3210. La calibration a été établie avec des standards de polystyrène (Polymer Laboratories). Le THF a été utilisé ici aussi comme solvant avec un débit de 1mL/min.

2. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Les analyses de résonance magnétique nucléaire RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées à la Faculté de Pharmacie de l'Université Montpellier I, sur un spectromètre Bruker (AMX300) opérant à 300 MHz. Le chloroforme (CDCl_3), l'acétone ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$), le diméthylsulfoxyde ($\text{DMSO-}d_6$) et le diméthylformamide ($\text{DMF-}d_7$) deutérés ont été utilisés comme solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à l'étalon interne tétraméthylsilane (TMS). Les analyses de Diffusion par RMN (DOSY) ont été effectuées au plateau technique de l'UM2 sur un spectromètre Bruker Avance AQS600 RMN fonctionnant à 600MHz, équipé avec une sonde Bruker multinucléaire à gradient z inversé capable de produire des gradients dans la direction z avec des forces de 55 G cm^{-1} . Les spectres DOSY ont été récupérés depuis le logiciel topspin de Bruker avec le programme ledbpgp2s. La longueur de pulsation du gradient δ était de 5ms pour s'assurer de l'atténuation totale du signal.

3. Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés avec un spectromètre Perkin-Elmer 1760 FT-IR équipé d'un système de réflexion totale atténuée (attenuated total reflection : ATR).

4. Diffusion Dynamique de la Lumière

Les expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées à l'Université Montpellier 2, bâtiment 17, 3^{ème} étage sur un appareil Malvern Instrument Nano-ZS muni d'un laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). La fonction de corrélation a été analysée via la « general purpose method (NNLS) » pour obtenir la distribution de coefficients de diffusion (D) des solutions. Le rayon hydrodynamique équivalent apparent (R_H) a été déterminé par la méthode des cumulants utilisant l'équation de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta G} \quad q^2 = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, G est la fréquence de relaxation, q est le vecteur de vague, η est la viscosité du milieu, et D_0 est le coefficient de diffusion translationnel à dilution infinie. Les valeurs moyennes de rayons ont été obtenues par 3 tests successifs. Les déviations standards ont été évaluées à partir de la distribution des rayons hydrodynamiques.

5. Spectroscopie de fluorescence

Les expériences de fluorimétrie ont été réalisées à l'Université Montpellier 2, bâtiment 17, 3^{ème} étage sur un fluorimètre RF 5302 Shimadzu (Japon) équipé d'une source de lumière de Xénon (UXL-150S, Ushio, Japon). Les spectres ont été enregistrés en excitation de 300 à 360 nm, pour une longueur d'onde d'émission de 394nm. Les fentes d'émission et d'excitation étaient de 5 nm et 3 nm, respectivement.

6. Spectroscopie de masse MALDI-TOF

Les analyses de spectrométries de masse ont été effectuées au plateau technique de l'UM2 sur un appareil Bruker Ultra-Flex MALDI-TOF, équipé d'un laser à l'azote (LSI, 337 nm, 10 ns durée de l'impulsion) et un détecteur. Les ions ont été accélérés par un potentiel de 25 kV et réfléchis avec un potentiel de 26.3 kV. Toutes les analyses ont été effectuées en mode "reflection" en utilisant comme matrice l'acide α -cyano-4-hydroxycinamique (HCCA) ou l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) avec NaI.

7. Microscopies électronique à transmission

Les images obtenues par microscope électronique à transmission (TEM) ont été obtenues à l'UM2 sur un instrument JEOL 1200 EXII opérant à un voltage de 120kV. Les échantillons de microscopie électronique à transmission ont été préparés par dépôt d'une goutte de solution contenant nos copolymères sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone, suivies par un séchage à l'air libre.

8. Spectroscopie ultraviolet visible

Les spectres UV-visible (UV-Vis) ont été effectués avec un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 35 à double faisceau, avec des cuves en quartz de trajet optique égal à 1 cm.

C. Etudes Physico-chimiques

1. Auto-assemblage en milieu Aqueux

a. Dissolution Directe

Typiquement, 25 mg de copolymère sont introduits dans un pilulier, soit avec 5 mL (concentration 3 mg/mL) soit avec 25mL d'eau ultra-pure, (concentration 1 mg/mL). Le pilulier est soumis à l'ultraturax pendant 30 minutes puis soumis à une forte agitation pendant 1 heure, avant d'être passé au bain à ultrasons et filtré (0,45 μ m).

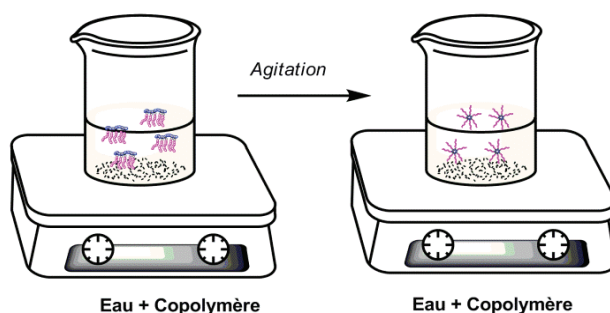


Figure V-1 Dissolution directe

b. Nanoprécipitation

Typiquement, 25mg de copolymère sont introduits dans un pilulier, avec 5mL de DMSO et soumis à une forte agitation pendant 1 heure. Ensuite 25 mL d'eau ultrapure sont ajoutés au milieu à l'aide d'un pousse seringue (débit 1 mL/mn, seringue Terumo 60mL). Une fois l'ajout terminé, l'agitation est laissée pendant 5 heures supplémentaires. Puis le contenu du pilulier est transvasé dans un boudin de dialyse (MWCO 3500Da) et la dialyse a lieu pendant 2 jours contre de l'eau milli Q. (changement de l'eau extérieure toutes les 5heures) On récupère le contenu du boudin de dialyse après 2 jours puis on pèse notre échantillon pour déduire une concentration en polymère dans notre solution. La solution est également filtré (0,45 μ m PTFE microfiltres).

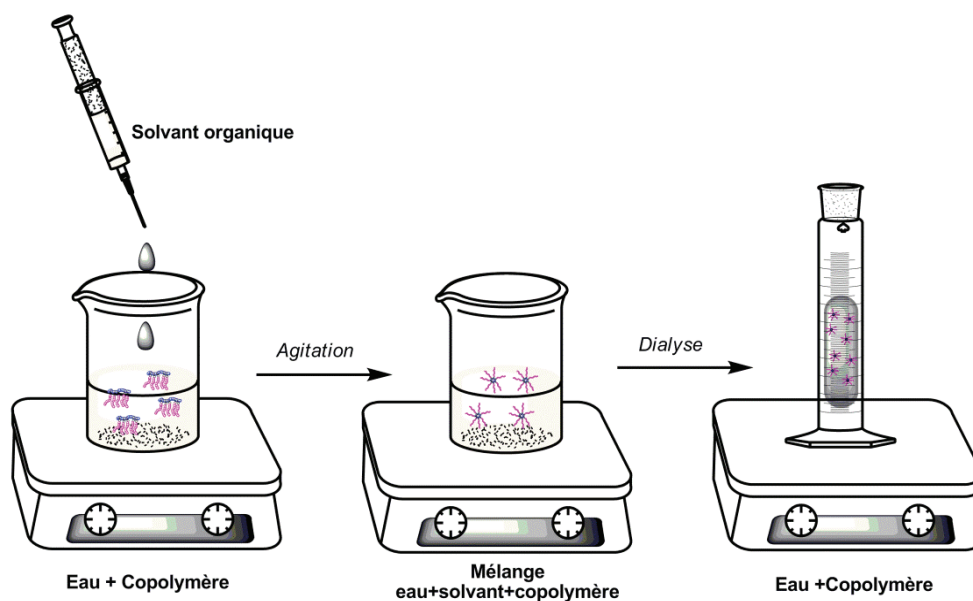


Figure V-2 Nanoprécipitation

c. Détermination de la taille des objets

A partir des solutions de polymères à 1.0 mg.mL^{-1} préparées au préalable par l'une des 2 méthodes décrites précédemment, la taille des nano-objets en solution a été déterminée en les analysant par diffusion dynamique de la lumière.

d. Etude de la fluorescence du Pyrène en fonction de la concentration en copolymère

Les concentrations d'agréations critiques des copolymères ont été déterminées par spectroscopies de fluorescence en utilisant le pyrène comme sonde fluorescente. A partir d'une solution mère de pyrène ($C=6 \times 10^{-6} \text{ M}$ dans de l'acétone), 10 solutions contenant une concentration constante en pyrène et contenant le copolymère avec des concentrations différentes ont été préparées. Brièvement, 1 mL de la solution mère de pyrène a été introduit dans chacun des vials puis le solvant a été évaporé. Ensuite, 10 mL de solutions aqueuses avec différentes concentrations en polymère ont été ajoutés aux vials. La concentration finale en pyrène dans les solutions était de $6 \times 10^{-7} \text{ M}$. Après une nuit à température ambiante, les spectres d'excitation des solutions ont été enregistrés. Les valeurs d'excitation I_{337} et I_{333} , à 337 et 333 nm respectivement ont été utilisées pour les calculs qui suivent. Les concentrations d'agréations critiques ont été déterminées comme le point d'intersection des 2 droites sur le graphe du ratio d' I_{337}/I_{333} en fonction de la concentration en polymère.

2. Solubilisation et Encapsulation de Molécules Hydrophobes

a. Dissolution Directe

Typiquement, 50 mg de copolymère sont introduits dans un pilulier avec 10 mg de principes actifs avec 50 mL d'eau milli Q et soumis à l'ultraturrax pendant 30 minutes puis soumis à une forte agitation pendant 1 heure, avant d'être passé au bain à ultrasons et centrifugés pour se débarrasser de la curcumine résiduelle non encapsulée. Le filtrat obtenu est analysé par UV puis lyophilisé.

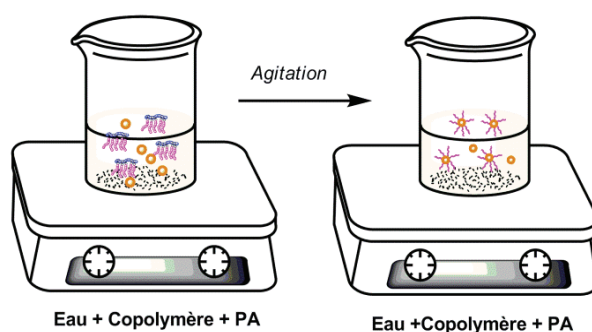


Figure V-3 Encapsulation par dissolution directe

b. Nanoprécipitation

Dans ce protocole, 50 mg de copolymère sont dissous dans 10 mL de diméthylsulfoxyde avec 10 mg de principes actifs sous agitation pendant 1 heure. Puis 40 mL d'eau ultra pure sont ajoutés au milieu à l'aide d'un pousse seringue (débit 1 mL/mn, seringue Terumo 60mL). Une fois l'addition terminée, l'agitation continue pendant 5 heures supplémentaires puis le contenu du pilulier est transvasé dans un boudin de dialyse (MWCO 3500Da). La dialyse est laissée pendant 48 heures en changeant le milieu extérieur 3 fois par jour. Ensuite le contenu est récupéré, filtré, pesé et analysé avant d'être lyophilisé.

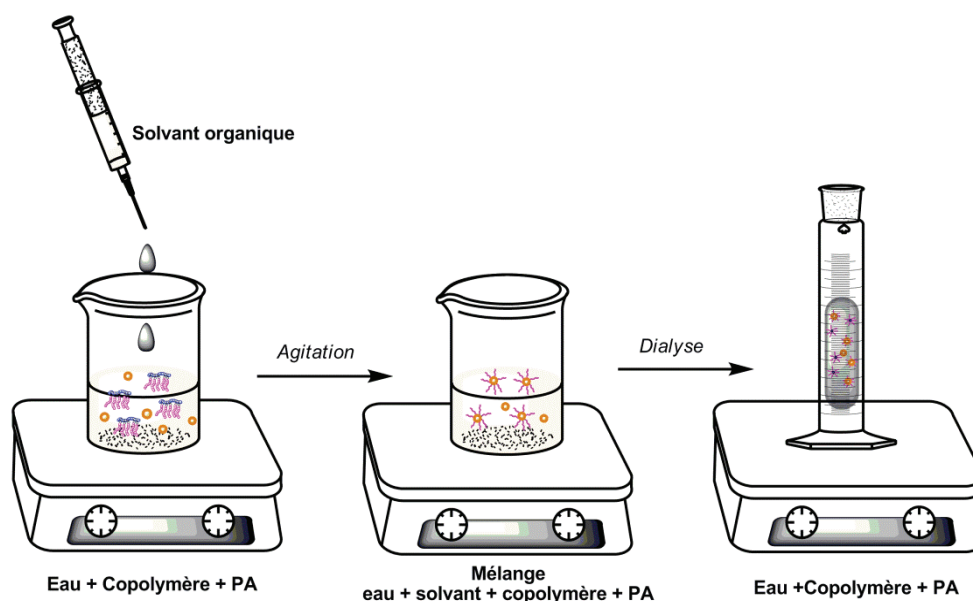


Figure V-4 Encapsulation par nanoprécipitation

c. Film-casting

Dans ce protocole, 50 mg de copolymère sont dissous dans 10 mL d'acétone avec 10 mg de principes actifs sous agitation pendant 1 heure. L'acétone est évaporée pour former un film contenant le copolymère et le principe actif. Puis 50 mL d'eau ultra pure sont ajoutés au milieu à l'aide d'un pousse seringue (débit 1 mL/mn, seringue Terumo 60 mL) sous faible agitation. Une fois l'addition terminée, la solution est agitée par l'ultraturrax pendant 30 minutes puis laissé sous faible agitation pendant 1 heure. Le contenu du pilulier est centrifugé. Le surnageant est récupéré puis pesé et analysé avant d'être lyophilisé.

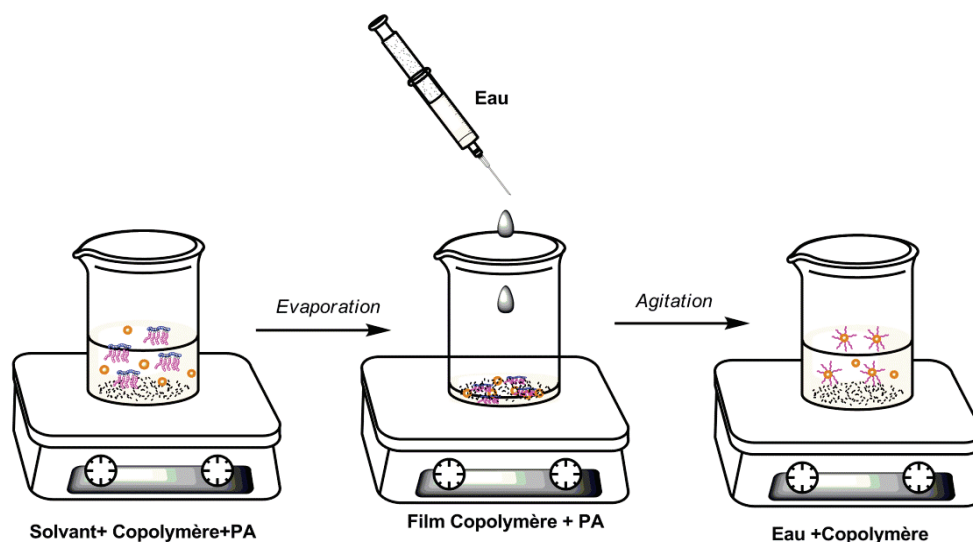


Figure V-5 Encapsulation par "film-casting"

d. Etude de la solubilité de molécules hydrophobes

Les mesures de de taux de charge et efficacité d'encapsulation (DL , LE) et les cinétiques de libération de curcumine ont été déterminées par spectrophotométrie UV. Les valeurs DL et LE ont été définies dans le chapitre 2 selon les équations 2.13, 2.14 et 2.15.

$$EE = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,initial}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.14}$$

$$DL_M = \frac{m_{PA,enc}}{m_{PA,enc} + m_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.15}$$

$$DL_m = \frac{n_{PA,enc}}{n_{PA,enc} + n_{copolymère}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.16}$$

Les nanoparticules chargées de principes actifs, préparées soit par dissolution directe soit par nanoprécipitation, soit par « film-casting », ont été préalablement filtrées et / ou centrifugées avant analyses pour se débarrasser du principe actif non encapsulé. Différentes courbes de calibration ont été réalisées pour évaluer la quantité de curcumine encapsulée, et pour suivre au mieux la libération de curcumine en fonction du milieu (PBS en présence de Tween 80 à 0,5% wt)

Composé	Solvant	[C] (mol.L ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Pyrène	Eau		394	
Curcumine	Eau/Acétone	2,5x10 ⁻⁵ à 2x10 ⁻⁶	425	56200
Curcumine	PBS+Tween80	10x10 ⁻⁶ à 2x10 ⁻⁸	425	38472
Curcumine	DMSO	2,5x10 ⁻⁵ à 2x10 ⁻⁶	425	53000
Clofazimine	Eau/Acétone	2,5x10 ⁻⁵ à 2x10 ⁻⁶	468	400000

e. Cinétique de libération in vitro

Le principe actif (PA) (20 mg) a été encapsulé dans les copolymères (50 mg) par la méthode de film-casting décrite précédemment en utilisant une solution de PBS (1x) à la place de l'eau ultra-pure. Après détermination de la quantité de principes actifs présente initialement dans la solution, 2 mL de cette solution sont prélevés et introduits dans un boudin de dialyse (MWCO 3500 Da) et placés dans un pilulier contenant 15 mL d'une solution de PBS (1x) avec 0,05% de Tween 80. Le Tween 80 est ajouté pour éviter la précipitation du principe actif une fois hors de la dialyse et des systèmes polymériques. Le milieu extérieur est prélevé et remplacé toutes les heures pendant les 8 premières heures puis chaque 24 heures jusqu'à 7 jours puis 3 jours plus tard, et le dernier prélèvement à 15 jours. Chaque milieu récupéré est stocké dans un pilulier et analysé par spectroscopie UV.

3. Préparation des émulsions de polymères et étude de dégradation

Les émulsions de polymère stabilisées ont été préparées à partir de 134 mg de PEG-*b*-PLA, 0,8 mL de PBS et 1,1 mL d'huile de squalène à l'aide d'un appareil homogénéisant Polytron® PT 3100 (Kinematica AG, Suisse) à 6 000 rpm pendant 5 minutes. 4 mg d'LD-indolicidine ont été mélangés au milieu pour produire l'émulsion contenant le copolymère dibloc et l'LD-indolicidine.

Une émulsion contenant le conjugué LD-indolicidine-PEG-*b*-PLA (18 mg) a été préparée de manière équivalente, dans une solution de PBS avec 20 mg de PEG-*b*-PLA.

Les différentes émulsions sont conservées à 4°C.

La stabilité des émulsions a été déterminée à 40°C, 25°C et 37°C par des observations visuelles. Les diamètres des particules ont été mesurés par la technique de diffusion de la lumière (Brookhaven 90 plus particle size analyzer, Brookhaven Instruments Limited, NY, USA).

La formulation du vaccin a été évaluée en dispersant à nouveau 200 µL des solutions mères émulsionnées dans une solution aqueuse de 1800µL et mélangés à l'aide d'une centrifugeuse dans un tube à essai à 5 rpm pendant 1 heure avant injection.

D. Analyses Biologiques

1. Utilisation des souris et éthique

Des souris femelles de souche BALB/c et C57BL/6 âgées de 6 à 8 semaines ont été obtenues à partir du Centre National des Animaux de Laboratoire. Toutes les souris ont été conservées au Laboratory Animal Facility du NHRI, Miaoli County, Taiwan. Toutes les études animales effectuées ont été approuvées par le "Institutional Animal Care and Use Committee" (NHRI-IACUC-101040-AC).

2. Culture des cellules dendritiques

Les cellules murines de moelle osseuse (BM) dérivées des cellules dendritiques (DC) ont été recueillies selon une méthode décrite précédemment. Brièvement, les cellules murines des moelle osseuse des souris de souche BALB/c ont été cultivées à une densité de 2×10^5 cellules/ml dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture pour un volume total de 10 mL complétés de 20 ng/mL d'un facteur de croissance granulocyte macrophage (GM-CSF, PeproTech, Rocky Hill, NJ).

Au jour 3, 10 mL de milieu de culture contenant 20 ng/ml de GM-CSF ont été ajoutés aux cellules.

Au jour 6, les cellules ont été récoltées de chaque boîte, lavées et comptées. Les cellules ont été ensemencées dans des boîtes 24 puits à une densité de 1×10^6 cellules par puits puis pulsées avec soit la LD-indolicidine soit le conjugué pour étudier l'influence de l'adjuvant sur la maturation des DC.

Les cellules dendritiques immatures (iDC) et les cellules dendritiques à maturation induite par les lipopolysaccharides (LPS, 100 ng/mL) ont également été incluses dans les contrôles négatifs et positifs.

Après 18 heures de culture à 37°C, les cellules sont récoltées et sont marquées de manière immunofluorescente avec les marqueurs de surface CD11c, CD40, CD80, CD86 (BioLegend, San Diego, CA) et sujettes ensuite à des analyses cytométriques en flux (BD LSR II). Les concentrations en chimiokines et cytokines présentes dans le surnageant ont été mesurés avec le test ELISA utilisant des anticorps selon les instructions du fabricant. (DueSet® ELISA Development kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

3. Etude des cellules lymphatiques et immunisation

Des souris de souche C57BL/6 ont été injectées sous-cutanée (s.c.) dans les deux pieds avec la LD-indolicidin (20 µg/souris), le conjugué LD-indolicidin-PEG-*b*-PLA (90 µg/souris), et les émulsions obtenues avec le squalène. Aux jours 1,3 et 9 après injection, les cellules lymphatiques des ganglions inguinal et poplitéal des souris immunisées ont été récupérées après re-suspension dans un tampon “red blood cell lysing buffer” (ACK buffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) pendant 1 minute. Les cellules sont collectées et marquées avec CD11b, CD11c, CD40, CD86, major histocompatibility complex (MHC) classe II (BioLegend, San Diego, CA) et soumis à une analyse cytométrique en flux (BD LSR II).

4. Etude sur les cellules tumorales

2×10⁵ cellules tumorales EG7 par souris ont été inoculées sous-cutanée sur leur flanc. A partir de l'apparition de tumeurs palpables, au 7ème jour, 10 µg de protéine OVA ont été administrés en sous-cutanée à la base de la queue des souris de souche C57BL/6 selon différentes formulations. La première est pure, la deuxième catégorie concerne les émulsions utilisant les adjuvants copolymère dibloc, mélange ou conjugué. La troisième et dernière catégorie a été formulée avec 300 µg/dose d'une suspension de phosphate d'aluminium (ADJU-PHOS®, Brenntag AG, Frederikssund, Danish).

Le volume des tumeurs a été obtenu avec l'utilisation d'un étrier (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Japan) selon deux dimensions, deux fois par semaine. Le volume est calculé selon la formule (longueur x largeur²)/2. Les souris ont été euthanasiées lorsque le volume de la tumeur a excédé 2 000 mm³ ou en cas de fragilité extrême. Le taux de survie a été calculé selon la méthode Gehan-Breslow-Wilcoxon.

5. Analyses statistiques

Les graphes et les analyses statistiques ont été réalisés avec Graphad Prism version 5.02 (GraphPad Software, Inc). La comparaison des courbes de survie a été réalisée en utilisant le test log-rank (Mautted-Cox). Les différences sont considérées insignifiantes lorsque $p < 0.05$.

E. Synthèses des copolymères greffés amphiphiles à base de poly(acide lactique), poly(acide glycolique) et oligo(éthylène glycol)

1. Protocole de synthèse général du monomère fonctionnel 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione

a. Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

i. Protocole A

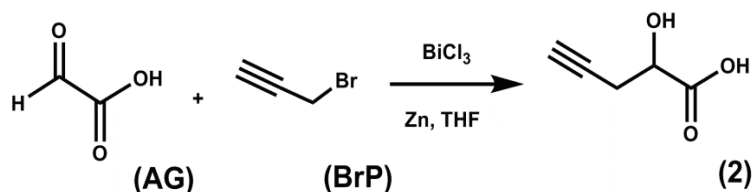


Schéma V-1 Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque

Typiquement, l'acide glyoxilique (5 g, 54,3 mmol, 1 éq) est introduit dans un ballon bicol de 250 mL contenant du zinc activé et 100 mL de tétrahydrofurane sous atmosphère d'argon. Le milieu réactionnel est placé sous agitation dans un bain de glace. Le trichlorure de bismuth (BiCl_3) (24 g, 76 mmol, 1,4 éq) est dissous dans 30 mL de tétrahydrofurane et est ajouté au milieu réactionnel lentement à l'aide d'une seringue. Le bromure de propargyle (8,47 mL, 76 mmol, 1,4 éq) est ensuite ajouté au goutte-à-goutte, et le milieu est laissé sous forte agitation à 0°C pendant 1 heure. Le bain de glace est ensuite retiré pour laisser le milieu revenir à température ambiante. La réaction est laissée sous agitation, à température ambiante, et sous pression d'argon pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est ensuite plongé dans un bain de glace, et 300 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (1N) sont ajoutés goutte-à-goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Le bain de glace est retiré et la solution obtenue est filtrée sur célite après trois heures d'agitation. Quatre extractions liquide-liquide sont réalisées sur la solution obtenues avec 4x300 mL d'éther diéthylique. La phase étherée récupérée est lavée à son tour avec 300 mL d'eau. La phase aqueuse est filtrée et réutilisée pour laver la phase étherée une seconde fois. 250 mL d'une solution saturée en chlorure de sodium sont ensuite utilisés pour laver une dernière fois la phase étherée. Le produit brut est récupéré après séchage sur sulfate de magnésium par évaporation sous pression réduite. Le produit pur (2) est obtenu après deux recristallisations dans le dichlorométhane et une sublimation sous pression réduite avec un rendement de 30 % (1,89 g, 16,6 mmol)

RMN ^1H (CD_6CO) δ 4,28 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$); 2,61 (m, 2H, $\text{HCCH}_2\equiv\text{CH}$); 1,99 (t, 1H, $\text{HCCH}_2\equiv\text{CH}$); 5,35 ; 4,9 ; 4,6 (m)

ii. Protocole B

- Synthèse du l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate (1)

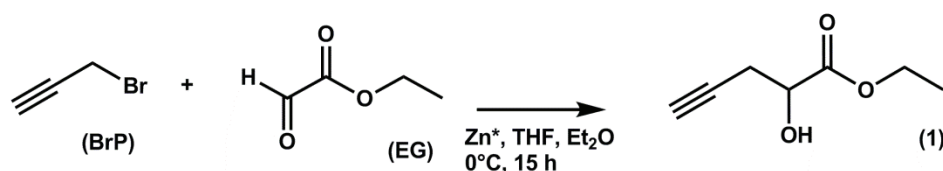


Schéma V-2 Synthèse de l'éthyl-2-hydroxy-4-pentynoate ; protocole B

Dans un ballon bicol de 500 mL surmonté d'une ampoule à brome sont introduits du bromure de propargyle à 80 % (1 mL, 7,87 mmol, 0,08 éq) et du Zn activé (9,61g, 1,5 éq, 147 mmol) avec du tétrahydrofurane (20 mL). L'éthylglyoxalate 50% (24 mL, 98 mmol, 1 éq) et le bromure de propargyle (14 mL, 111 mmol, 1,12 éq) sont ajoutés goutte-à-goutte au milieu réactionnel à 0 °C avec du tétrahydrofurane (20 mL) et de l'éther diéthylique (40 mL). La réaction se poursuit pendant 18h à température ambiante. Le milieu réactionnel est refroidi par un bain de glace puis la réaction est quenchée par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (3N) (50 mL). Les sels de zinc sont éliminés par filtration sur célite. Le filtrat est extrait avec de l'éther diéthylique (4x150 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Une huile verte foncée est récupérée et purifiée sur colonne de silice (éluant acétate d'éthyle/heptane : 70/30). Le produit final **(1)** (7 g, 49 mmol) est obtenu après distillation et séchage sous pression réduite ($P=10^{-3}$ mbar, 50°C) avec un rendement de 50 %.

RMN ^1H (CDCl_3) δ 4,24 (m, 1H+2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{R})$ et $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3., (s, 1H, CHOH), 2,61 (m, 2H, $\text{HCCH}_2\equiv\text{CH}$), 1,99 (t, 1H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2$), 1,23 (t, 3H, CH_2CH_3)

➤ Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque (2)

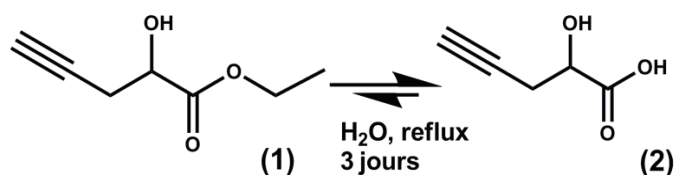


Schéma V-3 Synthèse de l'acide 4-pentynoïque ; protocole B

Dans un ballon monocol de 100 mL sont introduits le composé (1) (7 g, 49 mmol, 1 éq) et de l'eau (40 mL). Le milieu est chauffé à reflux et maintenu sous agitation durant 3 jours. Le milieu est quenché avec l'addition d'1 mL d'acide chlorhydrique concentré. La phase aqueuse est extraite à l'éther diéthylique (6x75 mL). Les phases étherées sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite jusqu'à la formation de cristaux marron. Le produit est ensuite recristallisé deux fois dans du dichlorométhane et filtré avant d'être ensuite sublimé ($P=10^{-3}$ mbar, 50°C) pour obtenir le produit (2) sous la forme de cristaux blancs (4 g, 35 mmol) avec un rendement de 71 %

RMN ^1H (CD_6CO) δ 4,28 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$); 2,1 (m, 2H, $\text{HCCH}_2\equiv\text{CH}$); 1,99 (t, 1H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2$); 2,34 (t, 3H, CH_2CH_3)

b. Synthèse de l'acide 2-2-bromoacétoxy-4-pentynoïque

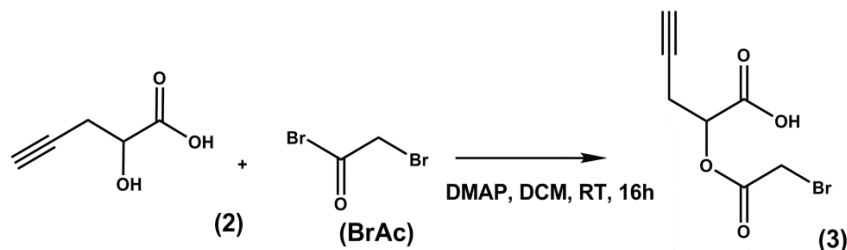


Schéma V-4 Synthèse de l'acide 2-2-bromoacétoxy-4-pentynoïque

Dans un ballon bicol de 100 mL surmonté d'une ampoule à brome sont introduits à 0 °C sous argon la N,N-diméthylaminopyridine (0,193 g, 1,75 mmol, 0,1 éq) et 50 mL de dichlorométhane sec. Ensuite, le bromure de bromoacétyle (3,53 g, 17,5 mmol, 1 éq) est ajouté lentement. Dans l'ampoule à brome, l'acide 2-hydroxy-4-pentynoïque **2** (2 g, 17,5 mmol, 1 éq) est mis en solution avec du dichlorométhane (30 mL) et de la triéthylamine (2,43 mL, 17,5 mmol, 1 éq). Le contenu de l'ampoule est versé dans le ballon goutte à goutte. Le milieu est laissé sous agitation pendant 16 heures sous argon à température ambiante. Ensuite le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite. Le milieu est repris avec de l'éther diéthylique (40 mL), pour précipiter les sels de brome, puis filtré sur célite avant d'être lavé avec de l'acide chlorhydrique 1N (20 mL) et avec une solution saturée en chlorure de sodium (4x20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif pour obtenir le composé (3) sous la forme d'une huile (3 g, 12,8 mmol) avec un rendement de 75 %

RMN ^1H (CDCl_3) δ 5,25 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})(\text{OCOR}')$), 3,95 (s, 2H, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{Br}$), 2,85 (q, 2H, $\text{HCCCH}_2\equiv\text{CH}$), 2,09 (t, 1H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2$)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ =177,44 ;166,23 ;78,28 ;75,05 ;72,13 ;36,97 ;21,52.

c. Synthèse de la 3-2-propynyl-1,4-dioxane-2,5-dione

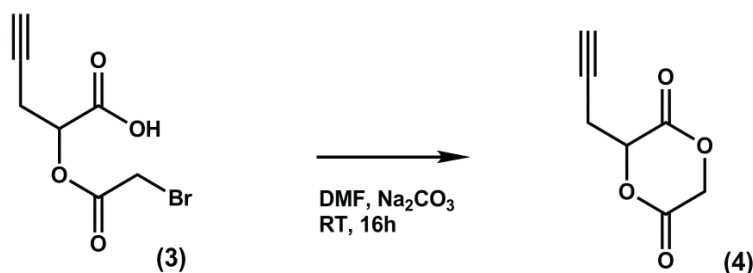


Schéma V-5 Synthèse de la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione

Dans un ballon tricol de 500 mL muni d'un agitateur et surmonté d'une ampoule à brome de 250 mL, le carbonate de sodium Na_2CO_3 (2,03 g, 19,2 mmol, 1,5 éq) est introduit puis le montage est mis sous flux d'argon. 150 mL de DMF distillé sont ajoutés sous argon. Le produit (3) (3 g, 12,7 mmol) est introduit dans l'ampoule à brome avec 150 mL de DMF sec. Le contenu de l'ampoule est ajouté goutte-à-goutte au milieu réactionnel pendant plus d'une heure. Le montage est laissé 17 heures à température ambiante. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite ($P=10^{-3}$ mbar, $T=50^\circ\text{C}$) et de l'acétone (100 mL) est ajoutée pour faire précipiter les sels. La solution est filtrée sur célite et évaporée sous pression réduite. Le produit final (4) (0,89 g, 5,76 mmol) est obtenu après extraction à l'éther, et recristallisation dans du CDCl_3 avec un rendement de 45%.

RMN ^1H (CD_6CO) δ 5,44 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{R})(\text{OCOR}')$), 5,32 et 5,0 (dd, 2H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$), 2,95 (m, 2H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}$), 2,54 (t, 1H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2$)

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3) δ 165,24;164,53;77,98;73,95;71,93;65,80;20,97

IR (ATR): 1746, 3264 cm^{-1} .

MS (ES) m/z (%) = 155,0 (45) [M^++H], 173,1 (100) [$\text{M}^++\text{H}+\text{OH}_2$]

2. Protocole de synthèse général pour la copolymérisation par ouverture de cycle du glycolide propargylé et du L-lactide avec la N,N-diméthylaminopyridine

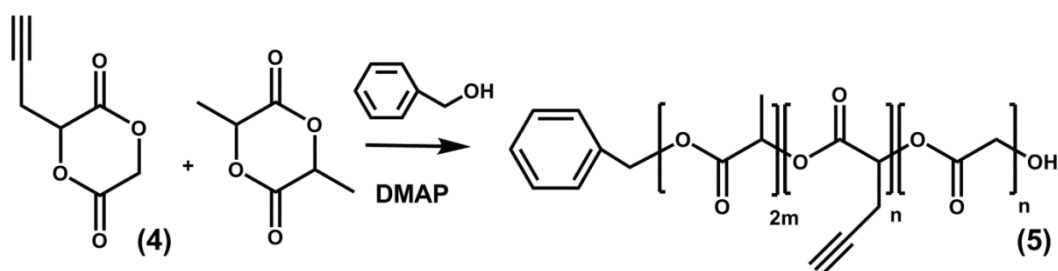


Schéma V-6 Copolymérisation du L-lactide et du glycolide propargylé

Dans un tube de schlenk sont introduits le composé (4) (0,2 g, 1,299 mmol, 10 éq), le L-lactide (0,187 g, 1,299 mmol, 10 éq), l'alcool benzylique (0,014 g, 0,1299 mmol, 1 éq), la N,N-diméthylaminopyridine (0,040 g, 0,33 mmol, 2,5 éq) et le dichlorométhane (3 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués puis le tube est placé dans un bain d'huile thermostaté à 30°C pendant 18 heures sous agitation et atmosphère inerte d'argon. Le produit final (5) est obtenu après précipitation dans du méthanol, filtration et évaporation sous pression réduite (rendement 58%, 0,224g).

RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,27 (m, CH ar) ; 5,17 (m, $\text{CHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 4,75 (m, $\text{C(O)CH(CH}_3\text{)O}$) ; 3,75 (m, $\text{C(O)CH}_2\text{O}$) ; 2,82 (s, $\text{CHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 2,0 (s, $\text{CHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 1,5 (m, $\text{C(O)CH(CH}_3\text{)O}$)

MALDI $(\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_8)_n$ (149) $_n$: région m/z 700 à 2800, $M_n=1487,3 \text{ g.mol}^{-1}$ correspond à 3 unités lactides et 6 unités glycolides propargylés

$M_{n, \text{RMN}} = 2800 \text{ g.mol}^{-1}$

$M_{n, \text{CES}} = 3800 \text{ g.mol}^{-1}$, $D = 1,4$

3. Protocoles de synthèses généraux pour les copolymères greffés par chimie « clic » : technique « Grafting onto »

a. Synthèse de copolymères greffés avec de l'anthracène

i. Synthèse du 9-azidométhyl Anthracène

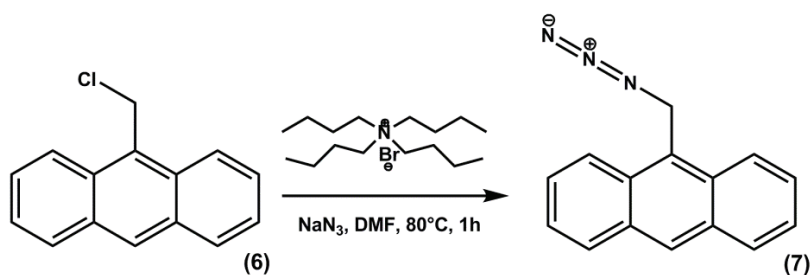


Schéma V-7 synthèse du 9-azidométhylanthracène

Dans un ballon de 250 mL sont introduits l'anthracène (1 g, 4,4 mmol, 1 éq), tétrabutylammonium bromide (0,071 g, 0,22 mmol, 0,05 éq) l'azoture de sodium (0,315 g, 4,8 mmol, 1,1 éq) et 40 mL de diméthylformamide. La réaction a lieu à 80°C sous agitation pendant 1 heure. Le diméthylformamide est ensuite évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est dissous dans un minimum de dichlorométhane et purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane. Le produit (7) est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 85% (0,872 g, 3,74 mmol)

RMN ^1H (CDCl_3) δ 8,26 (d, 2H, CH_2); 8,02(d, 2H, CH_2); 7,47-7,61 (m, 4H); 5,32 (s, 2H, CH_2N_3)

FT-IR (cm^{-1}): 2092 (N_3); 3057 (ar C-H); 700 ($\text{C}=\text{C}$ δ)

- ii. *Couplage de 9-azidométhylantracène par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre : P(PGA-co-GA-co-LA)-g-anthracène*

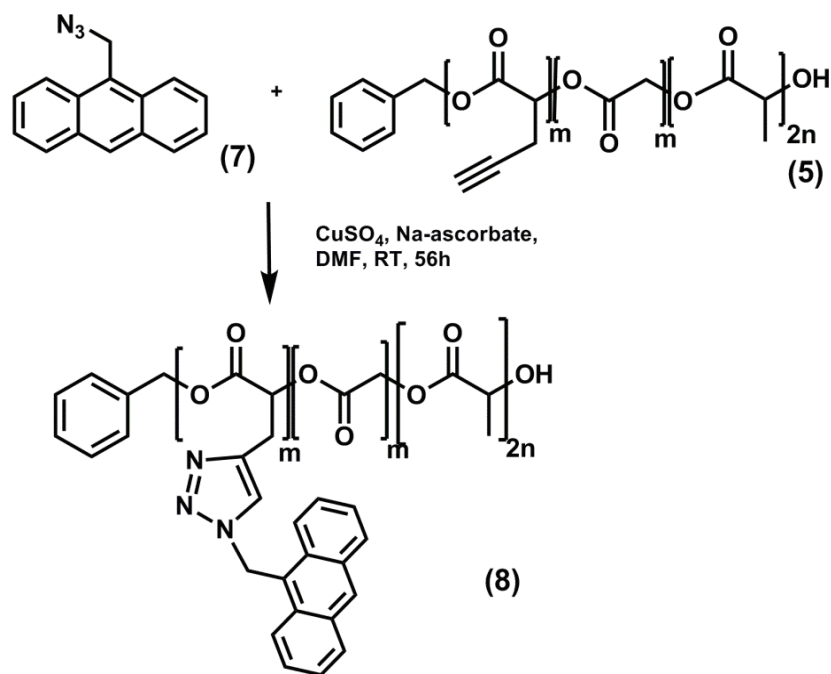


Schéma V-8 Réaction de chimie « clic »

Dans un tube de schlenk sont introduits le copolymère (5) (0,08 g, 0,37 mmol, 1 éq), l'antracène azidé (0,095 g, 0,4 mmol, 1,1 éq), l'ascorbate de sodium (0,014 g, 74,1 μmol , 0,2 éq) et le sulfate de cuivre (0,006 g, 37,1 μmol , 0,1 éq) dans du diméthylformamide sec (5 mL). La réaction a lieu à 40°C sous argon pendant 60 heures. Le milieu est ensuite purifié par dialyse dans l'acétone (MWCO 1000 Da) pendant 24 heures. L'acétone est évaporée sous vide, 80 mg du polymère (8) est récupéré avec un rendement de 90 %.

$M_{n,CES} = 5600 \text{ g.mol}^{-1}$; $\bar{D} = 1,2$

b. Synthèse de copolymères greffés avec l'oligo(éthylène glycol)

- i. *Synthèse d'un α -azido-oligo(éthylène glycol)*

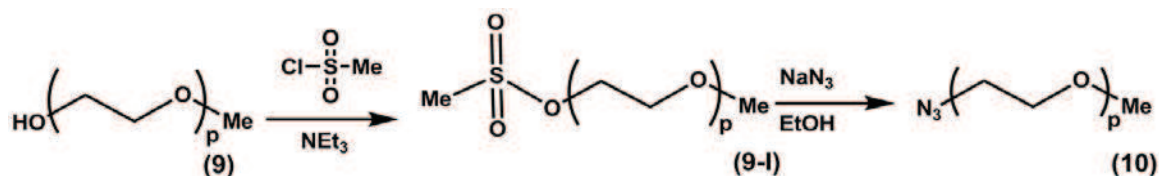


Schéma V-9 synthèse de l'α-azido-ω-méthoxy-oligo(éthylène glycol)

La procédure a été adaptée de la littérature.

Dans un ballon monocol de 100 mL contenant du tétrahydrofurane (20 mL) sont introduits le méthoxy oligo(éthylène glycol) (9) (mOEG550, $M = 550 \text{ g.mol}^{-1}$, 2,0 g, 3,63 mmol, 1 éq), la triéthylamine (0,733 g, 7,26 mmol, 2 éq) et du chlorure de méthansulfonyle (0,828 g, 7,26 mmol, 2 éq). Après une nuit de réaction à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. De l'eau (40 mL) est alors ajoutée et des extractions avec du dichlorométhane sont réalisées (5x100 mL). Les fractions organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées à l'évaporateur rotatif pour obtenir la molécule intermédiaire (9-I).

Dans un ballon monocol de 100 mL contenant du diméthylformamide (40 mL) sont introduits le (9-I) (1,9 g, 3,02 mmol, 1 éq) et l'azoture de sodium (3,14 g, 30 mmol, 10 éq). Le mélange réactionnel est gardé sous agitation à température ambiante sous atmosphère inerte pendant 24 heures. Le diméthylformamide est éliminé sous pression réduite puis du dichlorométhane est ajouté (100 mL). Des lavages à l'eau (40 mL) et avec une solution saturée en chlorure de sodium (3x40 mL) sont réalisés. La phase organique est récupérée, séchée sur sulfate de magnésium, et concentrée sous pression réduite. L'oligo(éthylène glycol) fonctionnalisé en bout de chaîne (10) a été obtenu pur avec un rendement de 90%. (1,9 g)

RMN ^1H (CDCl_3) δ 3.58 (m, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 3.48(t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.32 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.30 (s, OCH_3)

- ii. *Couplage du α-azido-ω-méthoxy-oligo(éthylène glycol) par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre : P(PGA-co-GA-co-LA)-g-OEG*

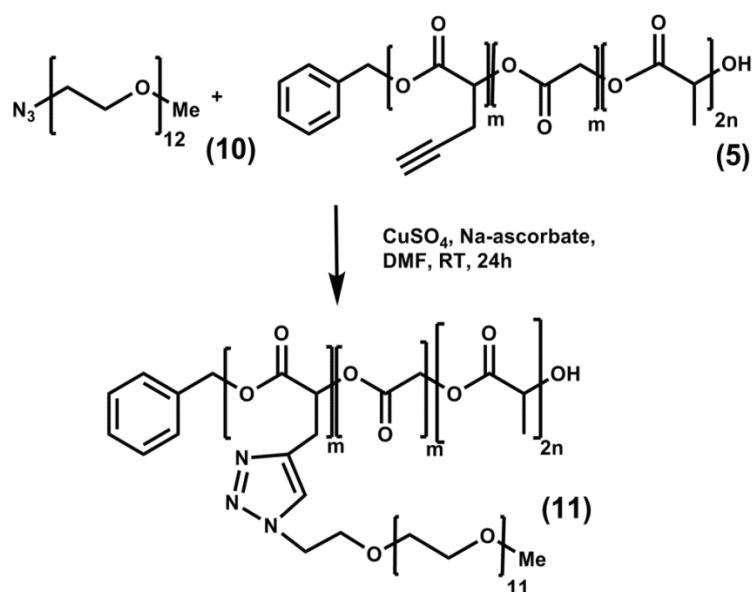


Schéma V-10 Obtention des copolymères greffés (11)

Dans un tube de schlenk sont introduits le copolymère (5) (50 mg, 160 μ mol, 1 éq), l' α -azido- ω -méthoxy-oligo(éthylène glycol) ($M_n = 550$ g.mol⁻¹, 184 mg, 330 μ mol, 2 éq), l'ascorbate de sodium (6.32 mg, 32 μ mol, 0.2 éq) et le diméthylformamide (2 mL). Trois cycles de gel-dégel sont réalisés puis une solution contenant du sulfate de cuivre (2,55 mg, 16,7 μ mol, 0,1 éq) dans du diméthylformamide est ajouté à travers le septum. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante sous atmosphère d'argon pendant 24 heures. Un suivi de la réaction a été effectué par infrarouge grâce à la disparition du pic caractéristique de la fonction azoture à 2100 cm⁻¹. Le produit brut est ensuite purifié par dialyse en présence d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) contre de l'eau distillé (MWCO 1000 Da). La solution est lyophilisée pour obtenir le copolymère greffé (11) (48 mg, rendement 45%).

RMN ¹H (DMSO-*d*₇) δ 7,9 (s, CHCH₂=CH), 7,5 (m, CH ar), 5,48 (m, CHCH₂=CH), 5,18 (m, C(O)CH(CH₃)O), 4,83 (m, C(O)CH₂O), 4,52 (s, CH₂CH₂N₃), 3,87 (s, CH₂CH₂N₃), 3,55 (m, O(CH₂)₂O), 3,33 (s, OCH₃), 3,29 (m, CHCH₂=CH), 1,58 (m, C(O)CH(CH₃)O)

$$M_{n,RMN}=4200 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M_{n,CES}= 6000 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D}=1,3$$

F. Synthèses de copolymères amphiphiles de type peigne à base de poly(acide lactique) et poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol))

1. Protocole général pour la synthèse de copolymères triblocs P(OEGMA)-b-PLA-b-P(OEGMA)

a. Protocole général pour la synthèse du macroamorceur bifonctionnel

i. Synthèse d'un poly(L-acide lactique) téléchélique

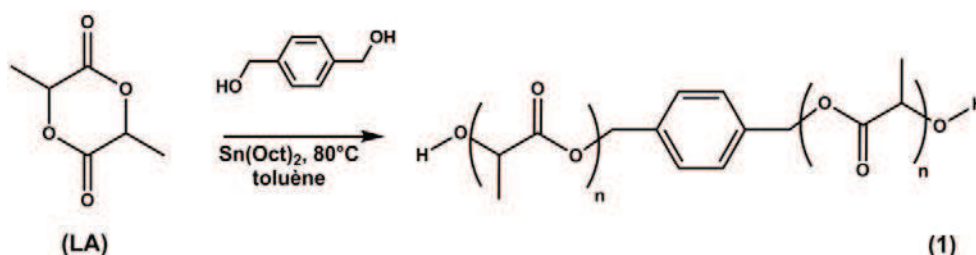


Schéma V-11 Synthèse du poly(acide lactique) α,ω hydroxylé PLA(OH)₂

Dans un tube de schlenk sont introduits le *L*-lactide (10 g, 69,4 mmol, 20 éq), l'octoate d'étain (0,281 g, 69,4×10⁻² mmol, 0,2 éq), 1,4-benzènediméthanol (0,480 g, 3,47 mmol, 1 éq), et du toluène sec (20 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués, puis le tube est placé dans un bain d'huile thermostaté à 80°C sous agitation pendant 4 heures. La réaction est quenchée par l'ajout d'un excès de solution d'acide chlorhydrique (1 N) dans du méthanol. Le polymère est ensuite récupéré après précipitation dans de l'éther diéthylique. Après filtration et séchage sous vide, 9 g de poly(acide lactique) pur (1) sont obtenus (rendement 90 %).

$$M_{n,CES} = 4600 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,1$$

$$M_{n,RMN} = 3000 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,30 (m, Ar-H); 5,14 (m, OCHCH₃C); 4,33 (m, OCHCH₃OH); 1,55 (m, OCHCH₃C).

ii. Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique)

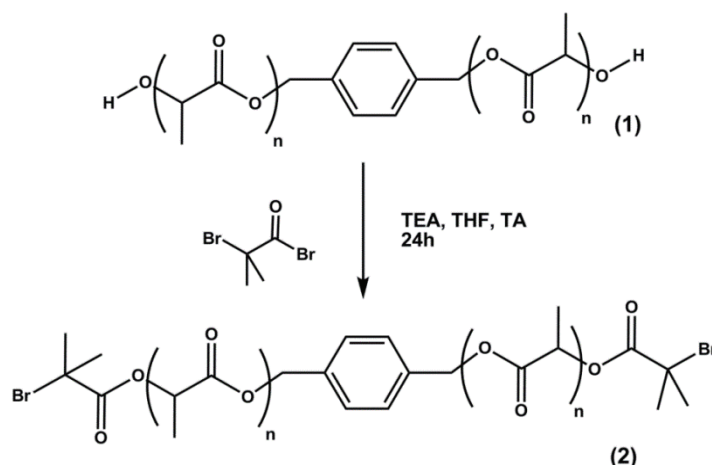


Schéma V-12 Synthèse de l' α,ω -dibromopoly(acide lactique) PLA(Br)₂

Dans un ballon monocol sont introduits le α,ω dihydroxypoly(acide lactique) (1) (5 g, $M_n = 2800 \text{ g.mol}^{-1}$, 1,79 mmol, 1 éq), la triéthylamine (0,542 g, 5,36 mmol, 0,75 mL, 3 éq) et du tétrahydrofurane sec. Le bromure de bromoisobutyryle (1,23 g, 5,36 mmol, 0,660 mL, 3 éq) est ensuite lentement ajouté à 0 °C, puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures dans des conditions anhydres. La solution est ensuite filtrée pour se débarrasser des sels de bromure de triéthylammonium et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le polymère obtenu est dissout dans un minimum de tétrahydrofurane et précipité dans du méthanol. Le polymère est ensuite récupéré par filtration et séché sous pression réduite pour donner 4,7 g de α,ω dibromopoly(acide lactique) (2) purs. (Rendement 80 %).

$$M_{n,CES} = 5700 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,1$$

$$M_{n,RMN} = 3300 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,29 (m, Ar-H); 5,14 (m, OCHCH₃C); 1,94 (d, OCOC(CH₃)₂Br); 1,55 (m, OCHCH₃C).

b. Protocole général de synthèse de copolymères triblocs par polymérisation radicalaire de type ATRP

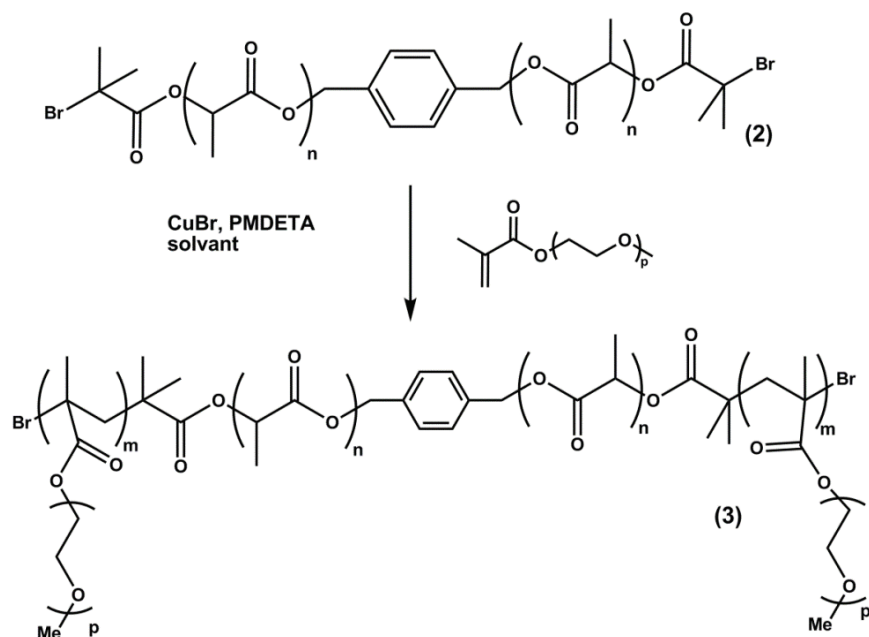


Schéma V-13 synthèse générale des copolymères triblocs

Dans un tube de schlenk sont introduits le macroamorceur difonctionnel (2) (0,5 g, $M_n = 3300 \text{ g.mol}^{-1}$, 0,151 mmol, 1 éq), le bromure de cuivre (I) (0,453 g, $30,3 \times 10^{-2}$ mmol, 2 éq), le bromure de cuivre (II) (0,034 g, $15,2 \times 10^{-2}$ mmol, 1 éq), le monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (2,27 g, 7,58 mmol, 50 éq), et de l'anisole (3 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués. Le tube est ensuite placé dans un bain d'huile thermostaté à 60°C sous atmosphère d'argon. Le N,N',N'',N''' -pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA, 0,105 g, $60,6 \times 10^{-2}$ mmol, 126 μL , 4 éq) est alors ajouté à travers le septum. Après 2 heures de réaction, la réaction est quenchée en plongeant le schlenk dans de l'azote liquide. Le produit brut est filtré sur alumine basique pour se débarrasser du cuivre et ensuite précipité dans du méthanol à froid. Après filtration et séchage sous pression réduite, le copolymère tribloc (3) est obtenu.

$$M_{n,CES} = 25000 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,52$$

$$M_{n,RMN} = 12000 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ 7,30 (m, Ar-H); 5,28 (m, $\text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{CH}_2$); 5,14 (m, OCHCH_3C); 4,06 (t, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OPEG}$); 3,53 (t, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OPEG}$); 3,36 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 1,55 (m, OCHCH_3C).

2. Protocole général pour la synthèse des copolymères diblocs

P(OEGMA)-b-PLA

a. Protocole général pour la synthèse du macroamorceur monofonctionnel ω -bromopoly(acide lactique)

i. Synthèse d'un ω -hydroxy poly(acide lactique)

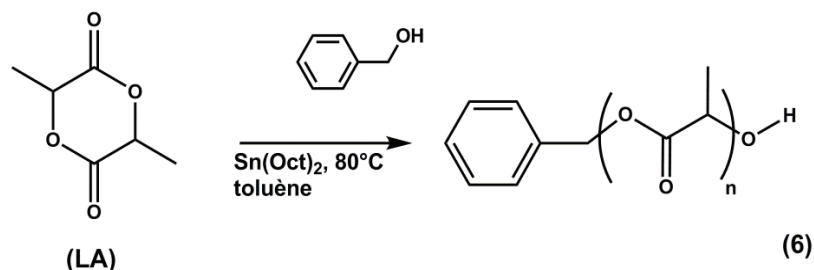


Schéma V-14 Synthèse du ω -hydroxyl-poly(acide lactique) PLA(OH)

Dans un tube de schlenk sont introduits le L -lactide (10 g, 69,4 mmol, 20 éq), l'octoate d'étain (0,141 g, 0,347 mmol, 0,1 éq), l'alcool benzylique (0,375g, 34 mmol, 1 éq), et du toluène sec (40 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués, puis le tube est placé dans un bain d'huile thermostaté à 100°C sous agitation pendant 3h 30. La réaction est quenchée par l'ajout d'un excès de solution d'acide chlorhydrique (1 N) dans du méthanol. Le polymère est ensuite récupéré après précipitation dans de l'éther diéthylique. Après filtration et séchage sous vide, 9 g de ω -hydroxypoly(acide lactique) pur (6) sont obtenus (rendement 90 %).

$$M_{n,CES} = 4500 \text{ g.mol}^{-1}; D = 1,14$$

$$M_{n,RMN} = 3600 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$\text{RMN } ^1\text{H (300 MHz, CDCl}_3) \delta 7,3 \text{ (m, Ar-H), } 5,2 \text{ (m, CH(CH}_3\text{)), } 1,57 \text{ (m, CH(CH}_3\text{))}$$

ii. Synthèse de l' ω -bromopoly(acide lactique)

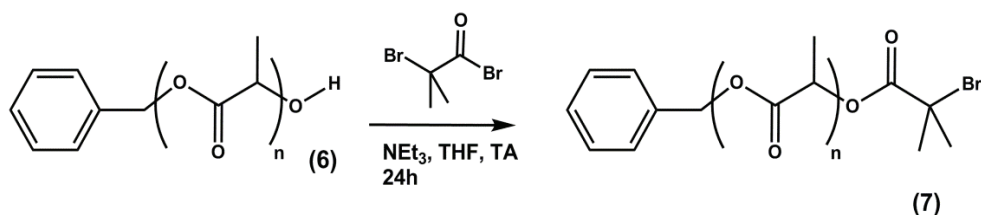


Schéma V-15 Synthèse de l' ω -bromopoly(acide lactique) PLA(Br)

Dans un ballon monocol sont introduits l' ω -hydroxypoly(acide lactique) (6) (5 g, $M_n = 3600 \text{ g.mol}^{-1}$, 1,38 mmol, 1 éq), la triéthylamine (470, 4 μL , 3,4 mmol, 2,4 éq) et du tétrahydrofurane sec. Le bromure de bromoisobutyryle (392,4 μL , 3,4 mmol, 2,43 éq) est ensuite lentement ajouté à 0 °C, puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures dans des

conditions anhydres. La solution est ensuite filtrée pour se débarrasser des sels de bromure de triéthylammonium et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le polymère obtenu est dissout dans un minimum de tétrahydrofurane et précipité dans du méthanol. Le polymère est ensuite récupéré par filtration et séché sous pression réduite pour donner 5,09 g de ω -bromopoly(acide lactique) (7) purs. (Rendement 98 %).

$$M_{n,CES} = 4700 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,18$$

$$M_{n,RMN} = 4000 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,3 (m, Ar-H), 5,2 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 1,94 (d, $\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$), 1,57 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)$)

b. Protocole général pour la synthèse des copolymères diblocs par polymérisation radicalaire de type ATRP

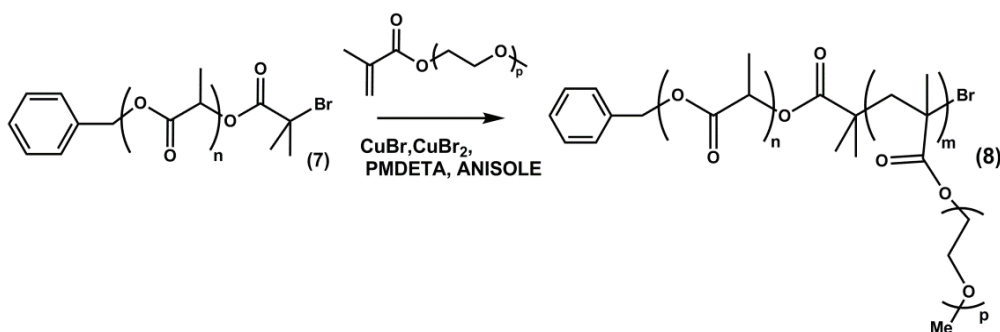


Schéma V-16 Synthèse de copolymères diblocs

Dans un tube de schlenk sont introduits le polymère monofonctionnel (7) (0,25 g, $M_n = 4000 \text{ g.mol}^{-1}$, $6,25 \times 10^{-2} \text{ mmol}$, 1 éq), le bromure de cuivre (I) ($0,0089 \text{ g}$, $6,25 \times 10^{-2} \text{ mmol}$, 1 éq), le bromure de cuivre (II) ($0,0069 \text{ g}$, $3,125 \times 10^{-2} \text{ mmol}$, 0,5 éq), le monomère méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) ($0,74 \text{ g}$, $1,56 \text{ mmol}$, 25 éq), et de l'anisole (3 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués. Le tube est ensuite placé dans un bain d'huile thermostaté à 60°C sous atmosphère d'argon. Le N,N',N'',N''' -pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA, $25,30 \mu\text{L}$, $0,125 \text{ mmol}$, 2 éq) est alors ajouté à travers le septum. Après 2 heures de réaction, la réaction est quenchée en plongeant le schlenk dans de l'azote liquide. L'anisole est évaporée sous pression réduite puis le produit brut est filtré sur alumine basique. Après évaporation sous pression réduite, le copolymère dibloc (8) est obtenu.

$$M_{n,CES} = 11800 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,08$$

$$M_{n,RMN} = 13000 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,30 (m, Ar-H); 5,28 (m, $\text{CH}_2\text{Ar-H}$); 5,14 (m, CHCH_3); 4,06 (t, C(O)OCH_2); 3,53 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,36 (t, OCH_3); 1,55 (m, CHCH_3).

G. Synthèse de copolymères amphiphiles et fonctionnalisation pour moduler l'efficacité des principes actifs in vivo

1. Fonctionnalisation des systèmes triblocs

a. Protocole général pour la fonctionnalisation du bout de chaînes des monomères méthacrylates d'oligo(éthylène glycol)

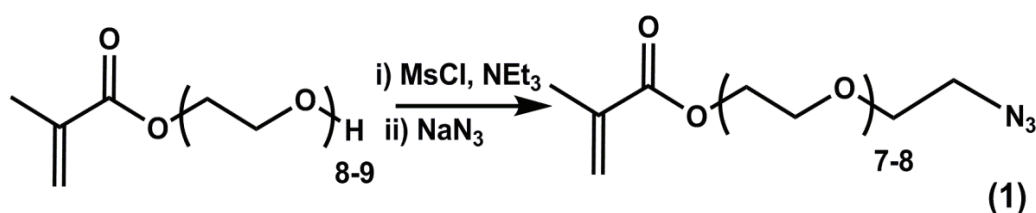


Schéma V-17 Modifications de la fonction hydroxyle terminale

La modification des fonctions hydroxyle terminales s'est effectuée en deux étapes. Dans une première étape, le monomère méthacrylate d' α -hydroxyoligo(éthylène glycol) (9) (5 g, 10 mmol, 1 éq) est introduit dans un ballon monocol de 100 mL avec 50 mL de tétrahydrofurane. Après complète dissolution, la triéthylamine (2,80 mL, 2 mmol, 2 éq) est ajoutée au mélange réactionnel. Le ballon est placé dans un bain de glace sous agitation puis le chlorure de méthane sulfonyle (1,48 mL, 2 mmol, 2 éq) est ajouté. Une garde à chlorure de calcium est placée sur le ballon monocol, puis la réaction a lieu pendant une nuit à température ambiante sous agitation. En fin de réaction le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est repris dans de l'eau (50 mL) et extrait avec du dichlorométhane (3x100 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de magnésium avant d'être filtrées et concentrées à l'évaporateur rotatif.

Le produit intermédiaire est utilisé sans purification supplémentaire. Dans un ballon monocol de 250 mL sont introduits le produit intermédiaire, l'azoture de sodium (1,07 g, 10 mmol, 10 éq) dans du diméthylformamide (50 mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 48 heures entouré de papier aluminium. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est solubilisé dans du dichlorométhane (200 mL) et lavé avec de l'eau (4x40 mL) puis avec une solution saturée en chlorure de sodium (4x50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis filtré et évaporée sous pression réduite pour donner le produit (1) avec un rendement de 87 % (4,9 g, 9,8 mmol).

$$M_{n,CES} = 700 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,7$$

$$M_{n,RMN} = 600 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,13 et 5,57 (s, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}$), 4,38 (t, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{R}$), 3,68 (m, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 1,95 (s, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}$)

IR (ATR): 2100, 1796 cm^{-1} .

b. Protocole général de synthèse des copolymères (P(OEGMA)OMe-co-P(OEGMA) N_3)-b-PLA-b-(P(OEGMA)OMe-co-P(OEGMA) N_3)

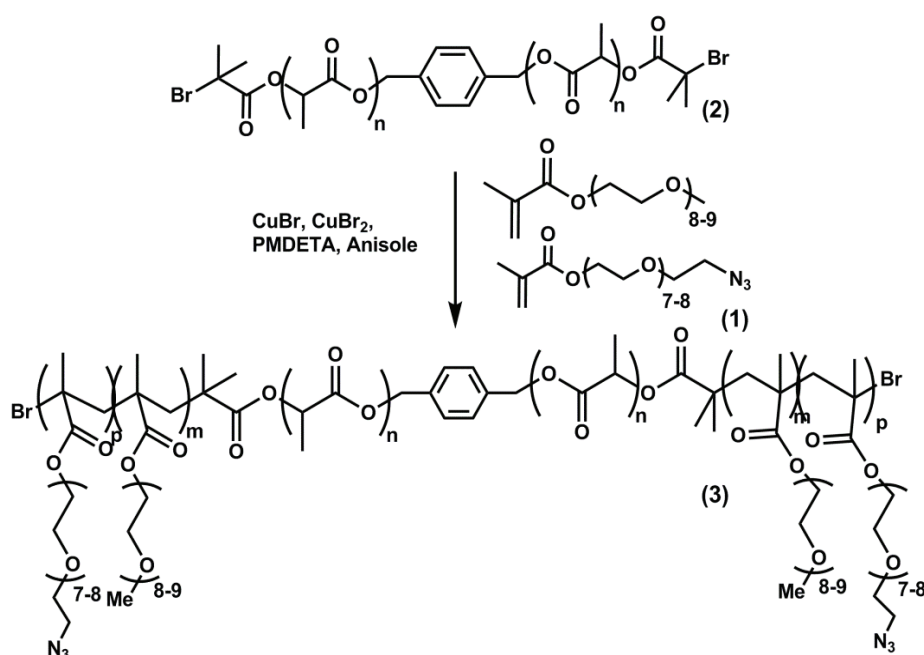


Schéma V-18 Copolymère tribloc fonctionnalisé en bout de chaîne par des azotures

Dans un tube de schlenk sont introduits le polymère difonctionnel (2) (0,25 g, 8,3 mmol, 1 éq), le bromure de cuivre (I) (0,024 g, 0,17 mmol, 2 éq), le bromure de cuivre (II) (0,024 g, 0,17 mmol, 2 éq), avec le méthacrylate d'α-méthoxyoligo(éthylène glycol) (1,78 g, 3,74 mmol, 45 éq) et le méthacrylate d'α-azidooligo(éthylène glycol) (0,21 g, 0,42 mmol, 5 éq) dans l'anisole (5 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués. Le tube est ensuite placé dans un bain d'huile thermostaté à 60°C sous atmosphère d'argon. Le pentaméthyl-diéthyl-triamine (PMDTEA, 69 μL , 0,33 mmol, 4 éq) est alors ajouté à travers le septum. Après 2 heures de réaction, la réaction est quenchée en plongeant le schlenk dans de l'azote liquide. L'anisole est évaporée sous pression réduite. Le produit est dissous avec un excès de tétrahydrofurane et filtré sur colonne d'alumine basique puis concentré à l'évaporateur rotatif pour obtenir le composé (3) (0,16 g, 16,1 μmol).

$M_{n,CES} = 9900 \text{ g.mol}^{-1}$; $\bar{D} = 1,26$

$M_{n,RMN} = 9200 \text{ g.mol}^{-1}$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,3 (m, Ar-H), 5,2 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 4,25 (m, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{R}$), 3,8 (m, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 3,3 (s, OCH_3), 2,2 (m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}$), 1,57 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 0,95 (m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}$)

IR (ATR): 2100, 1796 cm^{-1} .

c. Protocole général de couplage de la Rhodamine B isothiocyanate

Dans un tube de schlenk sont introduits le copolymère (3) fonctionnalisé (0,16 g, $3,26 \times 10^{-3}$ mmol, 2 éq), la propargylamine (42 μL , 0,652 mmol, 40 éq), le bromure de cuivre (I) (0,009 g, $6,27 \times 10^{-2}$ mmol, 3,84 éq) et un minimum de tétrahydrofurane. Trois cycles de gel-dégel sont réalisés puis le pentaméthyl-diéthylène-triamine (100 μL , 0,479 mmol, 29,4 éq) est rajouté au milieu réactionnel. La réaction a lieu pendant 24 heures à température ambiante pour générer *in situ* le produit intermédiaire.

Dans un autre tube de schlenk la rhodamine B thioisocyanate (0,05 g, $9,32 \times 10^{-2}$ mmol, 5,7 éq) est solubilisée dans un minimum de tétrahydrofurane. La solution est ajoutée au milieu réactionnel à l'aide d'une canule. Le milieu réactionnel est laissé à température ambiante sous atmosphère d'argon une nuit supplémentaire. Le milieu est ensuite récupéré et purifié par dialyse (MWCO 3500 g.mol^{-1}) contre du tétrahydrofurane. Le contenu de la dialyse est récupéré après 24 heures et filtré (0,45 μm). Une deuxième dialyse est réalisée contre de l'eau (MWCO 3500 g.mol^{-1}) pour obtenir le produit (4) après filtration (0,45 μm) et lyophilisation.

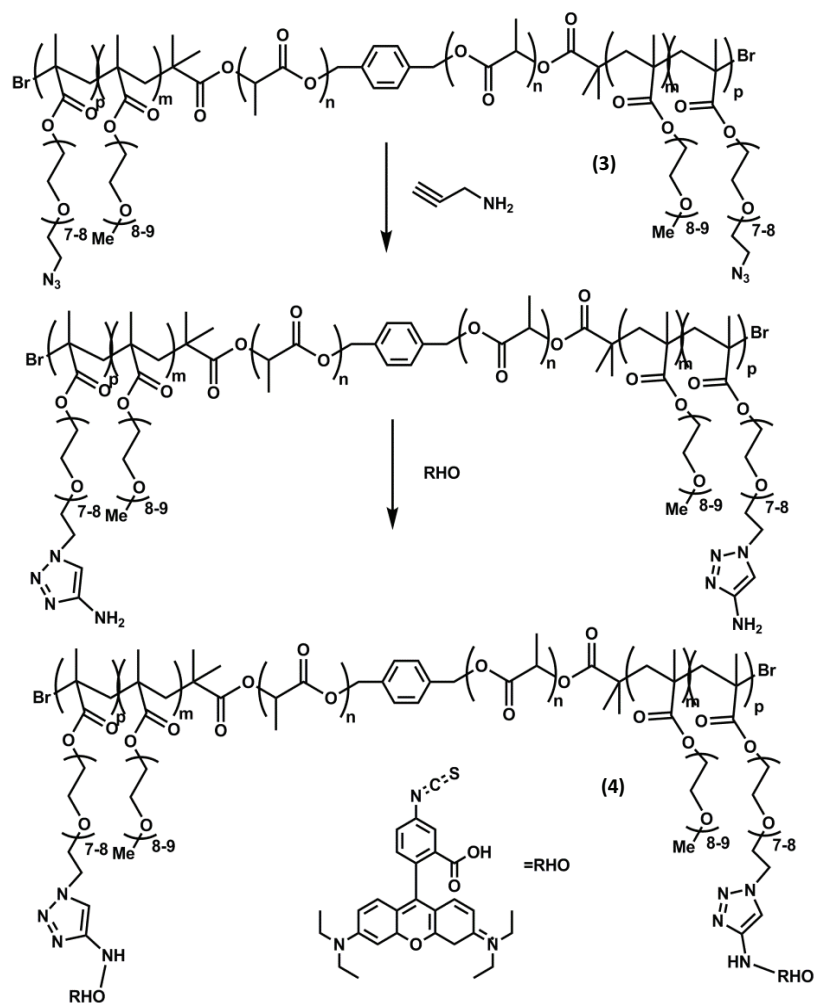


Schéma V-19 Couplage de la rhodamine B sur le copolymère tribloc

$$M_{n,CES} = 9900 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,26$$

IR (ATR): 2100, 1796 cm⁻¹.

2. Synthèse et fonctionnalisation d'un copolymère dibloc linéaire

a. Synthèse du ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique)

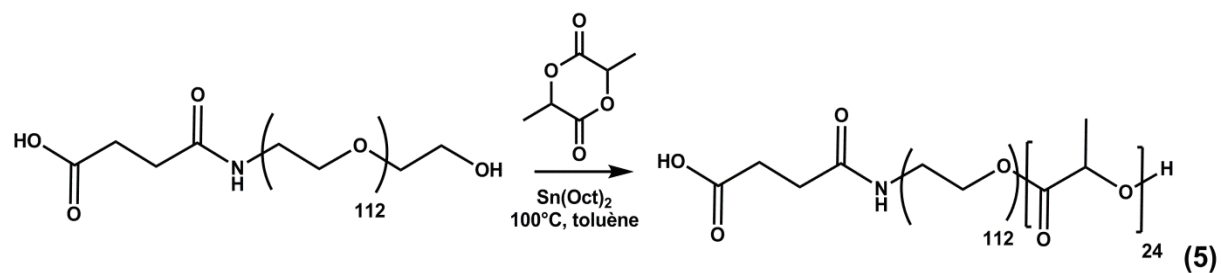


Schéma V-20 Synthèse de l' ω -carboxyl-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique)

Dans un tube de schlenk sont introduits le *L*-lactide (0,88 g, 2 mmol, 20 éq), l'octoate d'étain (0,008 g, 2×10^{-2} mmol, 0,2 éq), l'amorceur α -hydroxy- ω -carboxypoly(éthylène glycol) (0,5 g, 0,1 mmol, 1 éq), et du toluène sec (3 mL). Trois cycles de gel-dégel sont effectués, puis le tube est placé dans un bain d'huile thermostaté à 100°C sous agitation pendant 5 heures. La réaction est quenchée par l'ajout d'un excès de solution d'acide chlorhydrique (1 N) dans du méthanol. Le polymère est ensuite récupéré après précipitation dans de l'éther diéthylique. Après filtration et séchage sous vide, 0,61 g de copolymère dibloc (5) sont obtenus (rendement 45 %).

$$M_{n,CES} = 9100 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,08$$

$$M_{n,RMN} = 6300 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5,3 (m, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$), 4,3 (m, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 3,8 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,6 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{H})$), 2,5 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{H})$), 1,6 (m, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$).

b. Activation et protection de la fonction acide carboxylique du bloc poly(éthylène glycol)

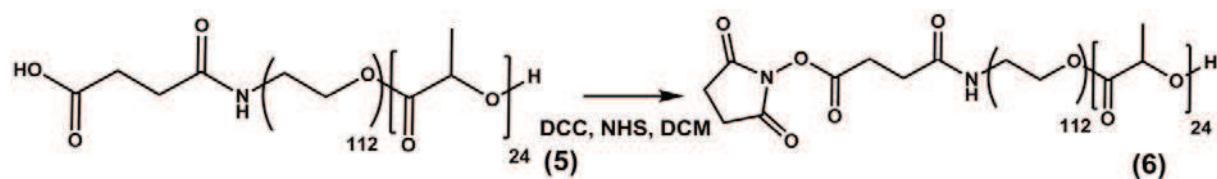


Schéma V-21 Activation de la fonction terminale acide carboxylique

Dans un ballon de 25 mL sont introduits le copolymère (5) (0,60 g, $9,7 \times 10^{-2}$ mmol, 1 éq) et du dichlorométhane sec (4 mL). Le N-hydroxysuccinimide (0,02 g, $1,9 \times 10^{-1}$ mmol, 2 éq) est ensuite ajouté lentement à 0°C sous agitation et le ballon est placé sous atmosphère d'argon. La dicyclohexylcarbodiimide (0,04 g, $1,9 \times 10^{-1}$ mmol, 2 éq) est solubilisée dans du dichlorométhane sec (3 mL) et transférée au milieu réactionnel à travers le septum. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures. La solution est ensuite refroidie à 0°C. La solution est filtrée pour se débarrasser de la dicyclohexylurée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le polymère fonctionnalisé succinimide-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique) (6) est récupéré après précipitation, filtration et séchage sous pression réduite, avec un rendement de 85 % (0,54 g, 8×10^{-2} mmol).

$$M_{n,CES} = 9000 \text{ g.mol}^{-1}; \bar{D} = 1,1$$

$$M_{n,RMN} = 6700 \text{ g.mol}^{-1}$$

RMN ^1H (CDCl_3) δ 5,2 (m, 1H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$), 4,3 (m, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 3,7 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,9 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{N})$), 2,8 (m, 4H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,6 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{N})$), 1,6 (m, 3H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$)

c. Couplage du copolymère dibloc amphiphile avec le peptide immuno-stimulateur : la LD-indolicidine

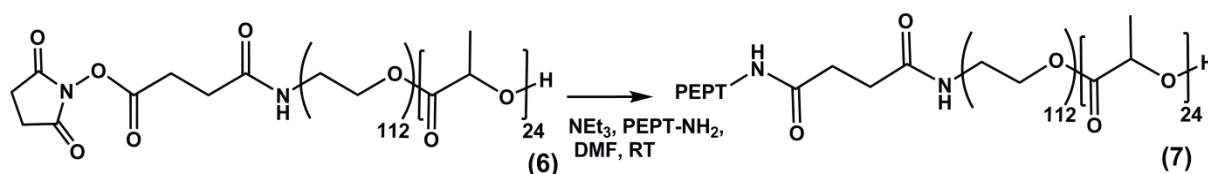


Schéma V-22 Couplage avec l'indolicidine

Dans un tube de schlenk sont introduits la LD-indolicidine (0,17 g, $8,9 \times 10^{-2}$ mmol, 1,1 éq) et du diméthylformamide sec (2 mL). La triéthylamine ($\approx 0,9$ mL) est ensuite ajoutée pour atteindre un pH entre 7 et 9. Ensuite, une solution de copolymère (6) (0,54 g, 8×10^{-2} mmol, 1 éq) dissoute dans du diméthylformamide sec (5 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte dans le Schlenk. La réaction est laissée à température ambiante pendant 18 heures. La solution est ensuite précipitée dans de l'éther diéthylique refroidi par un bain de glace pour se débarrasser de la triéthylamine pour obtenir le composé couplé (7) LD-indolicidin-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide lactique) avec un rendement de 76%. (m=0,593 g, 68,9mmol)

RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_7\text{NO}$) δ 11,5 (m, H Peptide), 7,6-6,8 (m, H Peptide), 5,2 (m, 1H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$), 4,3 (m, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 4,2 (m, H Peptide), 3,7 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,9 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 2,6 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 1,6 (m, 3H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$), 1,1 (m, H Peptides)

ANNEXES

A. Liste des communications orales ou par affiche

Communications orales

- Séminaire Franco-Polonais, Montpellier Novembre 2011 (anglais)
- GFP Méditerranée, Marseille, Novembre 2012 (Français)
- Journée des Jeunes chercheurs, SCF, Montpellier, Décembre 2012 (anglais), **Prix de communication orale SCF**
- Journée des Polyméristes Languedociens, Montpellier, Décembre 2012 (français)
- GFP-BGP, Lille, Novembre 2013 (français)
- GFP Méditerranée, Montpellier, Novembre 2013 (français)
- EUPOC 2014, Gargnano (Italie), Mai 2014 (anglais), **Bourse Fondation Balard Chaire Total**

Communications par affiches

- COPAMPHI 2012, 10 -13 juin 2012, Toulouse, France.
- Journées Franco-thèques, 12-13 juillet 2012, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France.

B. Publications

- Y. Bakkour, V. Darcos, F. Coumes, S. Li, J. Coudane, *Polymer*, **2013**, 54(7), 1746-1754
- F. Coumes, V. Darcos, S. Li, D. Domurado, J. Coudane, *Polymer Chemistry*, **2013**, 4, 3705-3713
- X.Hu, S.Li, F.Coumes, V.Darcos, J.laikeehim, P.Bron, *Nanoscale*, **2013**, 5(19), 9010-901
- F. Coumes, C-Y. Huang, C-H Huang, J. Coudane, D. Domurado, S. Li, V. Darcos, M-H Huang, *Biomaterials* (submitted)

Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles à base de poly(acide lactique) et de poly(éthylène glycol) pour la délivrance de principes actifs

RESUME

Ce travail avait pour but de synthétiser et caractériser des copolymères amphiphiles à base de poly(éthylène glycol) (PEG) et de poly(acide lactique) (PLA) pour la confection de systèmes de délivrance de principes actifs (PA). Les polymères ont été choisis pour leur biocompatibilité et de leur biorésorbabilité. Plusieurs architectures de copolymères amphiphiles ont été créées et leur comportement auto-associatif en milieu aqueux ainsi que leur capacité à encapsuler des principes actifs ont été étudiés. Tout d'abord, un copolymère greffé a été synthétisé par copolymérisation d'un monomère fonctionnel, le glycolide monopropargylé, avec du L-lactide pour obtenir un squelette polyester fonctionnel sur lequel des branches hydrophiles de PEG ont été greffées avec plusieurs degrés de substitution. Ensuite, un copolymère peigne tribloc a été synthétisé à partir d'un bloc central PLA dont les extrémités de chaînes ont été modifiées pour permettre l'amorçage de la polymérisation de méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) avec des taux de substitution variables. L'étude de l'auto-assemblage et de la capacité à encapsuler des PA a révélé que l'architecture et la balance hydrophile/hydrophobe sont des facteurs déterminants pour la nature des objets formés et leur potentiel d'encapsulation. Enfin, des stratégies de fonctionnalisation ont été mises en place afin d'augmenter et de moduler l'efficacité des PA encapsulés. Ceci est illustré par le couplage d'une molécule fluorescente modèle et, dans le cadre d'une collaboration, par la conjugaison d'un peptide immunostimulateur sur un système dibloc amphiphile. La comparaison à d'autres formulations a montré que le conjugué permettait de moduler et renforcer l'efficacité du PA utilisé.

Mots-clés : synthèse, polymère, polyester, amphiphile, auto-assemblage.

Synthesis and characterization of amphiphilic copolymers based on poly(lactic acid) and poly(ethylene glycol) towards drug delivery systems

ABSTRACT

The objective of this work was to synthesize and characterize amphiphilic copolymers based on poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(lactic acid) (PLA) intended for drug delivery applications. The polymers were chosen regarding to their biocompatibility and bioresorbability. Different architectures of amphiphilic copolymers were prepared, and their behavior in aqueous media, as well as their abilities to encapsulate drugs were studied. First, a graft copolymer was synthesized through copolymerization of a functional monomer, monopropargylated glycolide, with L-lactide to yield a functionalized polyester backbone. The latter was then grafted with different densities of hydrophilic branches of PEG. Then, a brush-like triblock copolymer was synthesized through ROP and ATRP. To this end, chain ends of a telechelic block of PLA were modified to yield a macroinitiator able to initiate oligo(ethylene glycol) methacrylate polymerization with variable substitution degrees. Self-assembly and drug loading studies revealed that architecture and hydrophobic/hydrophilic balance played a major role on the nature of the formed objects and on their encapsulation potential. Finally, to modulate and increase the efficacy of encapsulated drugs, functionalization strategies were realized. This is illustrated by the linking of a fluorescent model molecule on a triblock brush-like copolymer and, in a collaboration project, the linking of an immunostimulant peptide on an amphiphilic diblock system. Comparison with other formulations revealed that the conjugate allowed modulating and reinforcing the drug's efficacy.

Keywords : synthesis, polymer, polyester, amphiphilic, self-assembly